

**Immunzytologischer Nachweis von
Coronavirus-Antigen
in Makrophagen des Liquor cerebrospinalis**

von Stefanie Dörfelt (geb. Gründl)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Immunzytologischer Nachweis von Coronavirus-Antigen in
Makrophagen des Liquor cerebrospinalis**

von Stefanie Dörfelt (geb. Gründl)

aus Tegernsee

München 2018

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Mitbetreuung durch: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Tag der Promotion: 10. Februar 2018

Meiner Familie

„Gib jedem Tag die Chance, der schönste deines Lebens zu werden.“

(Mark Twain)



INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT: CORONAVIRUSINFEKTIONEN DER FLEISCHFRESSER	2
1.	Allgemeines zur Biologie der Coronaviren	5
2.	Coronavirusinfektionen der Katzen, Frettchen und Hunde	12
2.1.	Coronavirusinfektionen der Katzen	12
2.1.1.	Felines enterales Coronavirus	13
2.1.1.1.	Ätiologie und Epidemiologie	13
2.1.1.2.	Pathogenese	13
2.1.1.3.	Pathologische Veränderungen	14
2.1.2.	Felines-infektiöse-Peritonitis-Virus	14
2.1.2.1.	Ätiologie und Epidemiologie	14
2.1.2.2.	Pathogenese	15
2.1.2.2.1.	Mutation	16
2.1.2.2.2.	Virusreplikation in Makrophagen	20
2.1.2.2.3.	Immunantwort	21
2.1.2.3.	Pathologische Veränderungen	24
2.1.2.3.1.	Makroskopie	24
2.1.2.3.2.	Histologie	25
2.1.2.3.3.	Immunfärbungen	25
2.2.	Coronavirusinfektionen der Frettchen	26
2.2.1.	Enterales Coronavirus der Frettchen	26
2.2.1.1.	Ätiologie und Epidemiologie	27
2.2.1.2.	Pathogenese	27
2.2.1.3.	Pathologische Veränderungen	27
2.2.2.	Systemisches Coronavirus der Frettchen	28
2.2.2.1.	Ätiologie und Epidemiologie	28
2.2.2.2.	Pathogenese	30
2.2.2.3.	Pathologische Veränderungen	31
2.3.	Coronavirusinfektionen der Hunde	33
2.3.1.	Canines enterales Coronavirus	33

2.3.1.1.	Ätiologie und Epidemiologie	34
2.3.1.2.	Pathogenese	35
2.3.1.3.	Pathologische Veränderungen	36
2.3.2.	Canines pantropisches Coronavirus	36
2.3.2.1.	Ätiologie und Epidemiologie	37
2.3.2.2.	Pathogenese	37
2.3.2.3.	Pathologische Veränderungen	38
2.3.3.	Canines respiratorisches Coronavirus	39
2.3.3.1.	Ätiologie und Epidemiologie	39
2.3.3.2.	Pathogenese	40
2.3.3.3.	Pathologische Veränderungen	41
III.	EIGENE STUDIE I.....	42
IV.	ERWEITERTE DISKUSSION DER STUDIE I.....	81
V.	EIGENE STUDIE II	91
VI.	ERWEITERTE DISKUSSION DER STUDIE II	104
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	112
VIII.	SUMMARY.....	114
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	116
X.	ANHANG	141
XI.	DANKSAGUNG	143

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACE-2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (angiotensin converting enzyme 2)
ADE	infektionsverstärkende Antikörper (antibody-dependent enhancement)
AK	Antikörper
Bcl-2	B-Zell-Lymphom 2
BCoV	bovines Coronavirus
BdCoV HKU 22	Großer-Tümmler-Coronavirus (bottlenose dolphin coronavirus), Stamm HKU 22
BMDM	Knochenmark-abgeleitete Makrophagen (bone marrow-derived macrophages)
BWCoV SW 1	Beluga-Wal-Coronavirus, Stamm SW1
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CRID	canine infektiöse Tracheobronchitis (canine respiratory infectious disease)
CCoV	canines Coronavirus
CD 3 antibody	Cluster-of-differentiation-3-Antikörper (ein Antikörper, der T-Lymphozyten anfärbt)
CD	zytoplasmatische Domäne (cytoplasmic domain)
CECoV	canines enterales Coronavirus
CoV	Coronavirus
CRCoV	canines respiratorisches Coronavirus (canine respiratory coronavirus)
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung (disseminated intravascular coagulation)
DQ	Diff-Quick-Färbung
engl.	Englisch
E-Protein	Hüllprotein (Envelope-Protein)
ECE	epizootische katarrhale Enteritis (epizootic catarrhal enteritis)

ECoV	equines Coronavirus
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fc-Rezeptor	Fragment-kristallisierbarer Rezeptor (fragment crystallisable receptor, Membranrezeptoren für verschiedene Immunglobulinisotypen)
FCoV	felines Coronavirus (feline coronavirus)
FECV	felines enterales Coronavirus (feline enteric coronavirus)
FIP	feline infektiöse Peritonitis (feline infectious peritonitis)
FIPV	felines-infektiöses-Peritonitis-Virus (feline infectious peritonitis virus)
FNA	Feinnadelaspiration
FP	Fusionspeptid
FrSCoV	systemisches Coronavirus der Frettchen (ferret systemic coronavirus)
FrECov	enterisches Coronavirus der Frettchen (ferret enteric coronavirus)
GFAP	gliales fibrilläres saures Protein (glial fibrillary acidic protein)
HCl	Chlorwasserstoff
HCoV	humanes Coronavirus
HCoV OC 43	humanes Coronavirus, Stamm OC 43
HCoV HKU 1	humanes Coronavirus, Stamm HKU 1
HE	Hämagglutininesterase
HECoV	humanes enterales Coronavirus
HIAR	hitzeinduzierte Antigendemaskierung (heat-induced antigen retrieval)
HR	Heptadenwiederholungen (heptaden repeats)
IHC	Immunhistochemie
IZC	Immunzytochemie
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

IL-1	Interleukin-1
Kbp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
lat.	Lateinisch
MERS-CoV	respiratorisches-Syndrom-Coronavirus des Mittleren Ostens (Middle East respiratory syndrome coronavirus)
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MHV	murines Hepatitis-Virus
modWS	modifizierte Wright-Färbung (modified Wright's staining)
ml	Milliliter
M-Protein	Membranprotein
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
NeuN	neuronales nukleäres Protein
nd	nicht durchgeführt
N-Protein	Nukleokapsidprotein
NSP	nicht-Strukturproteine
nm	Nanometer
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PAP	Papanicolaou-Färbung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase-chain-reaction)
PEDV	porzines-epidemisches-Diarrhoe-Virus
PHEV	porzines-hämagglutinierendes-Enzephalomyelitis-Virus (porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus)
Poly-A-3'	polyadenyliertes 3'-Ende
PRCoV	porzines-respiratorisches-Coronavirus (porcine respiratory coronavirus)
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (real-time quantitative PCR)
RBD	Rezeptorbindungsdomäne
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum

RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RtCoV	Ratten-Coronavirus
RT-PCR	reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (reverse transcription PCR)
RT-nPCR	geschachtelte reverse-Transkriptase- Polymerase- Kettenreaktion (reverse transcription nested PCR)
RT-qPCR	quantitative reverse-Transkriptase-Echtzeit-Polymerase- Kettenreaktion (quantitative reverse transcription real-time PCR)
SARS-CoV	schweres-akutes-respiratorisches-Syndrom-Coronavirus (severe acute respiratory syndrome coronavirus)
SP	Signalpeptid
S-Protein	Spike-Protein
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus (hitzebeständiges Bakterium)
TaqMan	Taq-Polymerase in Kombination mit speziellen fluorogenen Sonden
TNF-	Tumornekrosefaktor-
TGEV	übertragbares-Gastroenteritis-Virus (transmissible gastroenteritis virus)
TM	Transmembrandomäne
Tris-EDTA	Trismethylamin-Ethylendiamintetraacetat (spezieller Puffer mit einem pH-Wert von 8.0)
ZNS	Zentralnervensystem
3CLpro	3C-ähnliche Protease (3C-like protease)

I. EINLEITUNG

Coronavirusinfektionen sind in vielen Säugetierpopulationen endemisch. Sie rufen meist gastrointestinale oder respiratorische Symptome hervor oder verlaufen asymptomatisch (WOO et al., 2010; SELBITZ et al., 2011). Bei Katzen führt das feline Coronavirus (FCoV) selten zu Symptomen (FOLEY et al., 1997). Eine Mutation des Virus verursacht jedoch eine progressive, tödlich verlaufende systemische Erkrankung, die feline infektiöse Peritonitis (FIP) (ROBISON et al., 1971; FOLEY et al., 1997; HARTMANN, 2005; BROWN et al., 2009; PEDERSEN, 2009; KIPAR & MELI, 2014). Zur Diagnose einer FIP wird der Nachweis der Virusnukleinsäure mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder der Nachweis des FCoV-Antigens mittels Immunhistochemie (IHC) oder Immunzytochemie (IZC) genutzt. Die Aussagekraft der IZC zum Nachweis des FCoV-Antigens in Makrophagen aus Körperhöhlenergüssen wurde bereits untersucht (FELTEN et al., 2017a). Bei einer Manifestation der FIP im Zentralnervensystem ist jedoch meist kein Erguss vorhanden. Dies erschwert die Diagnose (WEISS & SCOTT, 1981a; FOLEY & LEUTENEGGER, 2001; HARTMANN, 2005; FISCHER et al., 2012). Bislang gibt es keine Untersuchungen zur Aussagekraft der IZC aus Liquor. Da der Liquor bei jungen Katzen nur in sehr geringen Mengen vorliegt und die enthaltenen Zellen aufgrund der chemischen Beschaffenheit des Liquors sehr fragil sind, müssen für die Durchführung einer IZC aus Liquor die Bearbeitungsmodalitäten angepasst werden (FRY et al., 2006). Aus diesem Grund gliedert sich diese Arbeit in einen ersten Teil, der die Möglichkeit der Verwendung vorgefärbter Ausstriche zur IZC untersucht und die Beurteilung verschiedener Vorbehandlungen beinhaltet. In einem zweiten Teil sollte die Aussagekraft der IZC aus Liquor zum Nachweis einer FIP beurteilt werden.

II. LITERATURÜBERSICHT: CORONAVIRUSINFEKTIONEN DER FLEISCHFRESSER

Coronavirusinfektionen wurden bei vielen Säugern beschrieben (MIHINDUKULASURIYA et al., 2008; SELBITZ et al., 2010; QUESENBERRY & CARPENTER, 2012; WOO et al., 2014). Meist verursachen sie milde Gastroenteritiden (z. B. bei Schwein, Hund, Katze, Frettchen, Kuh, Maus, Pferd, Hyäne, Kleinbär, Hase, Delphin, Mensch) oder respiratorische Symptome (z. B. bei Schwein, Hund, Frettchen, Kuh, Maus, Ratte, Wal, Mensch). Teils verläuft die Infektion auch asymptomatisch (Tab. 1) (GAO et al., 2009; WOO et al., 2010; SELBITZ et al., 2011; QUESENBERRY & CARPENTER, 2012; WOO et al., 2014).

Im Folgenden soll näher auf die Biologie, die Beschaffenheit und die Charakteristika der Coronaviren sowie spezieller auf Coronavirusinfektionen bei den Fleischfressern Katze, Frettchen und Hund eingegangen werden.

Tabelle 1: Überblick über Coronavirusinfektionen bei Säugern.

In Anlehnung an SELBITZ et al., 2010. Mit freundlicher Genehmigung des Georg Thieme Verlags (Lizenzvereinbarung, 30. August 2017).

TEGV: transmissibles-Gastroenteritis-Virus; PRCoV: porcines-respiratorisches-Coronavirus; PEDV: porcines-epidemisches-Diarrhoe-Virus; FCoV: felines Coronavirus; CECoV: canines enterales Coronavirus; HCoV: humanes Coronavirus; FrECoV: enterisches Coronavirus der Frettchen; SARS: schweres-akutes-respiratorisches-Syndrom; FrSCoV: systemisches Coronavirus der Frettchen; BCoV: bovines Coronavirus; PHEV: porcines hämagglutinierendes Enzephalomyelitis-Virus; HECoV: humanes enterales Coronavirus; MHV: murines Hepatitisvirus; RtCoV: Ratten-Coronavirus; CRCoV: canines respiratorisches Coronavirus; ECoV: equines Coronavirus; MERS: respiratorisches-Syndrom-Coronavirus des Mittleren Osten; BWCoV: Beluga-Wal-Coronavirus; BdCoV: Großer-Tümmeler-Coronavirus.

Ordnung	Nidovirales	
Familie	Coronaviridae	
Unter-familie	Coronavirus	
Virus	Abkürzungen	Hauptkrankheitsbild
Genus: <i>Alphacoronavirus</i> (Gruppe 1)		
Transmissibles Gastroenteritis-virus der Schweine	TGEV	Gastroenteritis
Porzines respiratorisches Coronavirus	PRCoV	respiratorische Symptome
Porzines-epidemisches-Diarrhoe-Virus	PEDV	Gastroenteritis
Felines Coronavirus	FECV	Gastroenteritis
	FIPV	feline infektiöse Peritonitis
Canines Coronavirus	CECoV	Gastroenteritis
	pantropisches CCoV	systemische Infektion

Tabelle 1: Fortsetzung.

Ordnung	Nidovirales	
Familie	Coronaviridae	
Unter- familie	Coronavirus	
Virus	Abkürzungen	Hauptkrankheitsbild
Humanes Coronavirus	HCoV-229E	respiratorische Symptome
	HCoV-NL63	respiratorische Symptome
Frettchen-Coronavirus	SARS-CoV	respiratorische Symptome
	FrECoV	Gastroenteritis
	FrSCoV	feline-infektiöse-Peritonitis-ähnliche Erkrankung
Genus <i>Betacoronavirus</i> (Gruppe 2)		
Bovines Coronavirus	BCoV	respiratorische Symptome, Enteritis
Humanes Coronavirus	HCoV-OC-43	respiratorische Symptome
	HCoV-HKU1	respiratorische Symptome
Humanes enterales Coronavirus	HECoV	Gastroenteritis
Porzines-hämagglutinierendes-Enzephalomyelitis-Virus	PHEV	Kümmern und Gastroenteritis
Murines Hepatitisvirus	MHV	Hepatitis, Enzephalitis, respiratorische Symptome, Gastroenteritis
Ratten-Coronavirus	RtCoV	respiratorische Symptome

Tabelle 1: Fortsetzung.

Ordnung	Nidovirales	
Familie	Coronaviridae	
Unter- familie	Coronavirus	
Virus	Abkürzungen	Hauptkrankheitsbild
Canines respiratorisches Coronavirus	CRCoV	respiratorische Symptome
Equines Coronavirus	ECoV	Enteritis
Schweres-akutes- respiratorisches-Syndrom- Coronavirus	SARS-CoV	respiratorische Symptome
Respiratorisches-Syndrom- Coronavirus des Mittleren Ostens	MERS-CoV	respiratorische Symptome, Multiorganversagen
Genus Gammacoronavirus (Gruppe 3)		
Beluga-Wal-Coronavirus	BWCoV-SW1	respiratorische Symptome, Leberversagen
Großer-Tümmeler-Coronavirus (bottlenose dolphin coronavirus)	BdCoV-HKU22	Enteritis

1. Allgemeines zur Biologie der Coronaviren

Coronaviren (CoV) werden der Familie der Coronaviridae zugeordnet, die zu den behüllten RNA-Viren und, zusammen mit den Familien Arteriviridae und Roniviridae, zur Ordnung der Nidovirales gehören (HAGEMEIJER et al., 2012). Coronaviren wurden erstmals 1965 bei Erkältungskrankheiten bei Menschen mit Symptomen einer Entzündung der oberen und unteren Atemwege entdeckt und 1968 aufgrund ihrer morphologischen Unterschiede gegenüber anderer Viren als eigene Familie definiert. Ein morphologisches Charakteristikum der CoV sind die in der Membranhülle eingelagerten Proteine, durch die sie im elektronenmikroskopischen Bild einer Krone gleichen (lat. corona: Kranz, Krone), was namensgebend für diese Virusfamilie ist (Abb. 1) (DE VRIES et al., 1997;

WOO et al., 2010; SELBITZ et al., 2010).

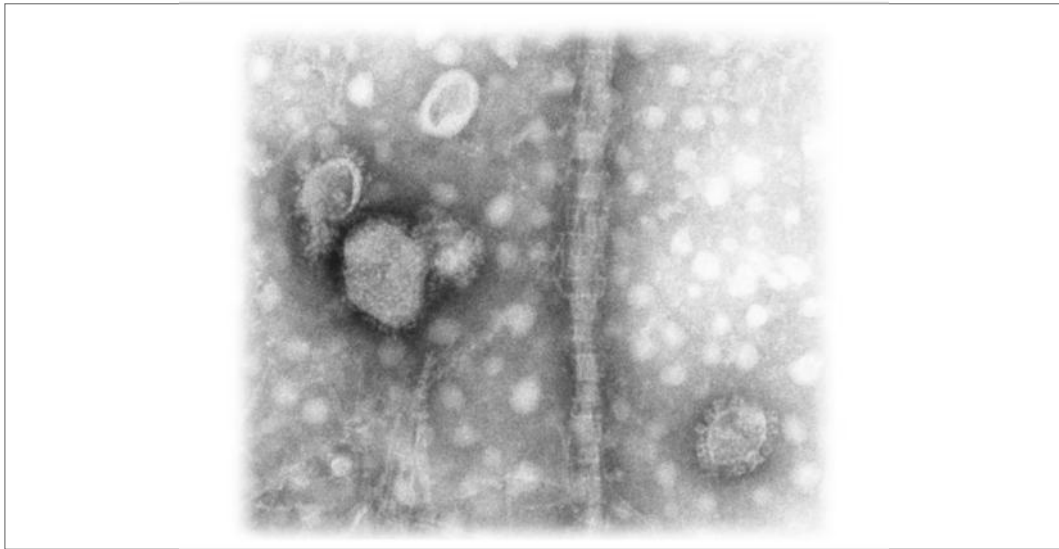


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Abbildung eines Coronavirus (Truthahn-Coronavirus).

Angefertigt vom Institut für Virologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Abdruck mit Erlaubnis von Prof. Dr. Gerd Sutter (24. Juli 2014).

CoV besitzen eine sphärische bis pleomorphe komplexe Struktur mit einer linearen einzelsträngigen RNA positiver Polarität und einer Genomgröße von 27,6–33,0 Kilobasenpaaren (Kbp). Sie tragen somit das größte und komplexeste Genom, das bei RNA-Viren bekannt ist. Im Inneren der Partikel liegt ein helikaler Ribonukleokapsidkomplex (DE VRIES et al., 1997; MODROW & FALKE, 2010; LIESS & MOENNIG, 2010; CHANG et al., 2016). Das Genom besteht aus über 29.000 Nukleotiden und 6-14 offenen Leserastern (open reading frames, ORF), die für Strukturproteine, nicht-Strukturproteine (NSP) und akzessorische Proteine codieren. Etwa zwei Drittel nehmen dabei ORF-1a und ORF-1b im Bereich des 5'-Endes (Cap-Struktur) ein (Abb. 2) (KIPAR & MELI, 2014; PEDERSEN, 2014b).

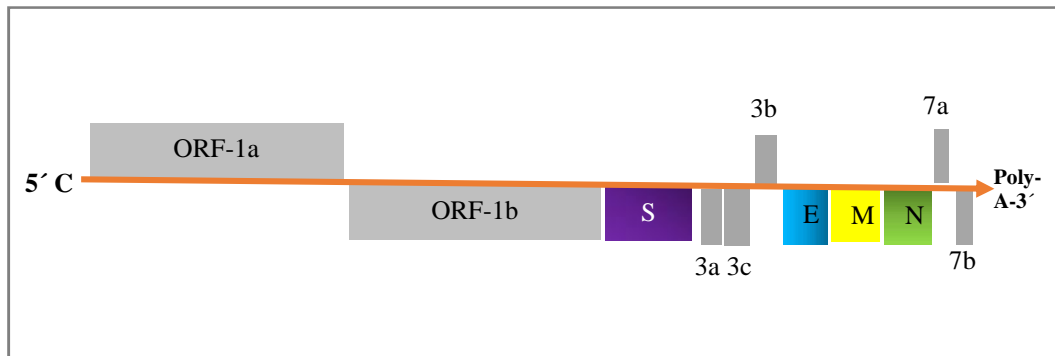


Abbildung 2: Genomischer Aufbau eines Coronavirus.

In Anlehnung an KIPAR & MELI, 2014. Mit freundlicher Genehmigung von SAGE Publications (Lizenzvereinbarung, 31. August 2017).

ORF: offene Leseraster (open reading frames); S: Spikeprotein; E: Hüllprotein; M: Membranprotein; N: Nukleokapsidprotein; 3a-c und 7a-b: nicht-Strukturproteine.

Diese beiden ORF sind Bestandteile des viralen Replikase-Gens, welches die RNA-Replikation einzelsträngiger RNA-Viren steuert. Daher tragen sie zur Produktion von Polypeptiden, wie NSP, bei. Die NSP sind wiederum an proteolytischen Prozessen, der Genomreplikation und an der Synthese der subgenomischen Boten-RNA (mRNA) beteiligt (Abb. 3) (DE VRIES et al., 1997; WOO et al., 2010; PEDERSEN, 2014b). Sie interagieren mit Komponenten des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparates der Zelle und bilden einen Replikation-Transkription-Komplex. Dieser enthält vielfältige, die RNA-Synthese beeinflussende Enzyme und Hilfsproteine. Über eine RNA-Polymerase werden negativ-Stränge der RNA codiert, die wiederum als Vorlage, sogenannte Templates, für die Produktion der mRNA positiver Polarität dienen (Abb. 3). Nicht die Templates, sondern nur diese einzelsträngige RNA positiver Polarität besitzt eine Cap-Struktur am 5'-Ende und ein polyadenyliertes 3'-Ende. Durch die beiden Enden werden gleichartige Strukturen der zellulären mRNA nachgeahmt, wodurch das Virus die zelleigenen Mechanismen zur viralen Proteinsynthese nutzen kann (PEDERSEN, 2014a). Eine charakteristische Eigenschaft der CoV während der Replikation besteht darin, wechselnde, zufällige Templates zu verwenden. Daraus resultieren häufige Rekombinationen und Mutationen (WOO et al., 2010). Ein Beispiel für die Verwendung zufälliger Templates und die Bildung einer neuen CoV-Art über eine homologe RNA-Rekombination ist die Entstehung des feline Coronavirus (FCoV) Typ II durch eine Rekombination zwischen dem FCoV-Typ-I und dem caninen Coronavirus (CCoV) (WOO et al., 2010).

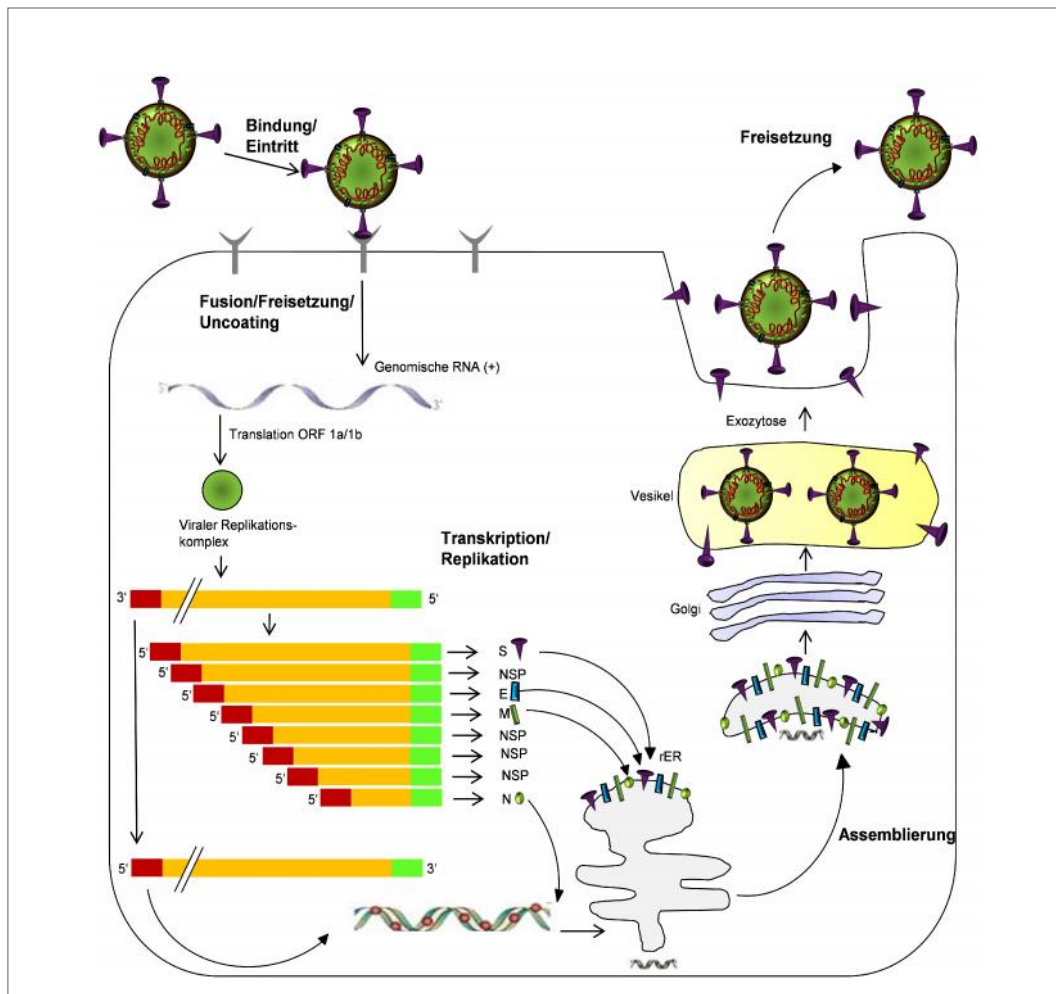


Abbildung 3: Replikation der Coronaviren.

In Anlehnung an STADLER et al., 2003. Mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group (Lizenzvereinbarung, 03. September 2017).

rER: rauhes endoplasmatisches Retikulum; Golgi: Golgi-Apparat; NSP: nicht-Strukturproteine; S: Spikeprotein; E: Hüllprotein; M: Membranprotein; N: Nukleokapsidprotein; RNA: Ribonukleinsäure; ORF: offene Leseraster.

Die ORF sind nicht nur in die Bildung der NSP, sondern auch in die Bildung von Strukturproteinen involviert (Abb. 3), denen unterschiedliche Funktionen zugeschrieben werden. Den ORF-1a und ORF-1b nachgelagert in Richtung 3'-Ende sind die Gene für die Strukturproteine, welche in folgender Reihenfolge angeordnet sind: Spikeprotein (S-Protein, Surface-Protein), Hüllprotein (E-Protein, Envelope-Protein), Membranprotein (M-Protein), Nukleokapsidprotein (N-Protein) und bei einigen CoV die Hämagglutininesterase (HE-Protein) (Abb. 2 und 4) (MODROW & FALKE, 2010; HAIJEMA et al., 2004; PEDERSEN et al., 2009; LIESS & MOENNIG, 2010; LE PODER, 2011; SELBITZ et al., 2010).

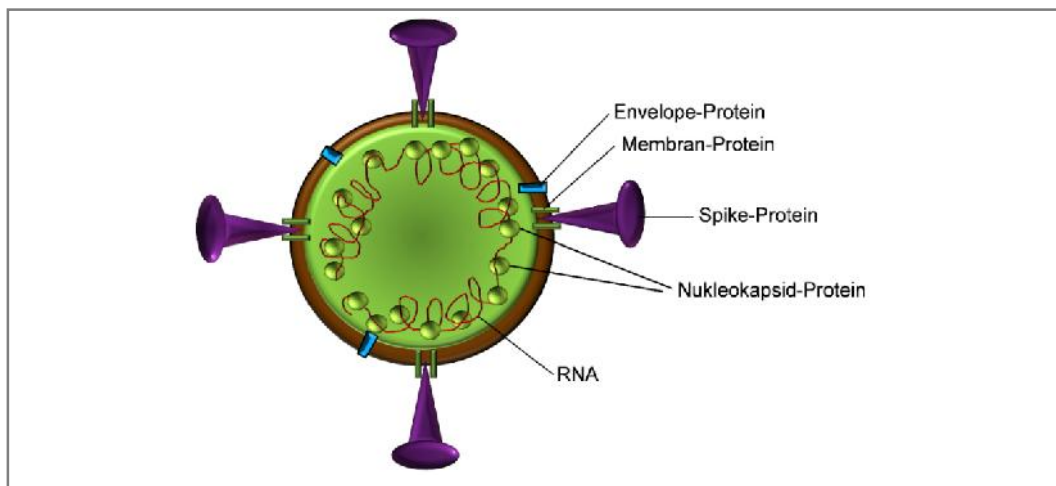


Abbildung 4: Morphologie eines Coronavirus.

In Anlehnung an KIPAR & MELI, 2014 und STADLER et al., 2003.

RNA: Ribonukleinsäure. Mit freundlicher Genehmigung von SAGE Publications und Nature Publishing Group (Lizenzvereinbarung, 31. August 2017 und 03. September 2017).

Von den Strukturproteinen ist das S-Protein für die Bindung der CoV an die Zielzelle essentiell. Das S-Protein wird dabei in ein S1-Protein, das für den Zelltropismus und die Bindung an die Zielzelle über spezifische Zellrezeptoren (z. B. Aminopeptidase N bei FCoV) verantwortlich ist, und in ein S2-Protein, das über zwei Regionen mit hydrophoben Wiederholungen, den sogenannten Heptadenwiederholungen HR 1 und HR 2, für die Zellfusion sorgt, unterteilt (Abb. 5) (PEDERSEN, 2014b; XIA et al., 2014). Die 3 HR-1-Spiralen im Mittelpunkt des S2-Proteins und die 3 daran anliegenden HR-2-Ketten ermöglichen die Freisetzung des positiven RNA-Einzelstranges in das Zytoplasma (Abb. 3 und 5) (XIA et al., 2014). Das N-Protein spielt bei der Synthese der viralen RNA und der Proteinsynthese sowie in der Virionstruktur eine wichtige Rolle. Nach Zusammenbau des Virions während seines Weges innerhalb zellulärer Membranstrukturen zur Zelloberfläche (Abb. 3) wird es als reifes Virion mittels Exozytose freigesetzt. Die Eigenschaften der unterschiedlichen Strukturproteine sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

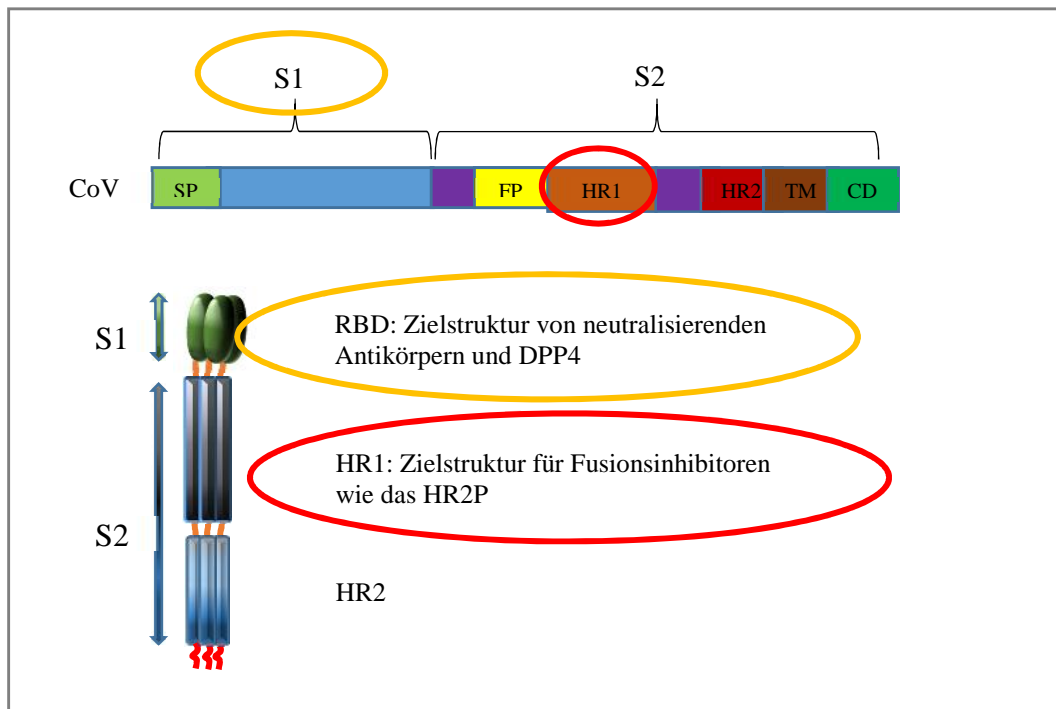


Abbildung 5: Struktur des Spikeproteins eines Coronavirus.

In Anlehnung an XIA et al., 2014. Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags (Lizenzvereinbarung, 03. September 2017).

SP: Signalpeptid; FP: Fusionspeptid; HR1 und HR2: Heptadenrepeats 1 und 2; TM: Transmembrandomäne; CD: zytoplasmatische Domäne; RBD: Rezeptorbindungsdomäne; CoV: Coronavirus; S1 und S2: Spikeproteine; S1: Anteil des Spikeproteins, das für den Zelltropismus und die Bindung an die Zielzelle über spezifische Zellrezeptoren verantwortlich ist; S2: Anteil des Spikeproteins, das für die Zellfusion sorgt.

Tabelle 2: Funktion der Strukturproteine und Enzyme der Coronaviren.

In Anlehnung an MODROW & FALKE, 2010. Mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags (Lizenzvereinbarung, 30. August 2017).

kD: Kilodalton; FCoV: felines Coronavirus; S: Spikeprotein; M: Membranprotein; N: Nukleokapsidprotein; ER: endoplasmatisches Retikulum; ADCC: antikörpervermittelte zytotoxische Zellreaktion; RNA: Ribonukleinsäure; HE: Hämagglutininesterase; ACE-2: Angiotensin-konvertierendes Enzym 2; SARS-CoV: schweres-akutes-respiratorisches-Syndrom-Coronavirus; OC 43: Serogruppe der humanen Coronaviren (HCoV) (fallen in Serogruppe 2); ?: nicht bekannt.

Protein	Größe (kD)	Eigenschaften	Funktionen
S-Protein	180–200	glykosyliertes Membranprotein Lokalisation in Virus- und Zytoplasmamembran infizierter Zellen Di- oder Trimer	1. Adsorption an Aminopeptidase N (z. B. FCoV) oder ACE-2 (z. B. SARS-CoV) 2. Induktion der Membranfusion 3. neutralisierende Antikörper 4. ADCC-Antwort
M-Protein	20–30	glykosyliertes Membranprotein Lokalisation in viraler Membran und ER-Membran infizierter Zellen	1. Interaktion mit N-Protein 2. Initiierung der viralen Morphogenese durch Penetration und Aufnahme in das ER-Lumen (Budding)
HE-Protein	65	glykosyliertes Membranprotein der Serogruppe OC43 Dimer	1. sekundäre Adsorption an die acetylierten Neuraminsäurerestern 2. Acetylesterase 3. Hämagglutinin 4. HämadSORPTION
N-Protein	50–60	phosphoryliert, stark basisch	1. Bindung an die RNA unter Bildung des helikalen Nukleokapsids 2. Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne des M-Proteins

Tabelle 2: Fortsetzung.

Protein	Größe (kD)	Eigenschaften	Funktionen
RNA- abhängige RNA- Polymerase	?	?	Bindung der genomischen und subgenomischen RNA
Protein- kinase	?	?	Regulation von Transkriptionsfaktoren
Protease	?	?	proteolytische Spaltung des Polymerasevorläuferproteins

Aufgrund der Prädisposition der CoV, häufig zu rekombinieren und mutieren, kann es zur Veränderung bestimmter Proteine (z. B. S-Protein, 3c-Protein) kommen. Durch diese Veränderungen können sich Zelltropismus und Pathogenität ändern. Dies kann zu letalen Krankheitsverläufen führen (MURRAY et al., 2010; WOO et al., 2010; KIPAR & MELI, 2014).

2. Coronavirusinfektionen der Katzen, Frettchen und Hunde

Bei Katzen kommen asymptomatische Infektionen, aber gelegentlich auch schwerwiegende, systemische Verläufe einer FCoV-Infektion nach Mutation des Virus vor (HARTMANN, 2005; KIPAR & MELI, 2014; PEDERSEN, 2014a). Aber auch bei Frettchen und Hunden sind systemische Krankheitsverläufe beschrieben (BUONAVOGLIA et al., 2006; DOMINGUEZ et al., 2011; ZICOLA et al., 2012).

2.1. Coronavirusinfektionen der Katzen

FCoV sind für nahezu alle Feliden infektiös (HARTMANN, 2005; BROWN et al., 2009; PEDERSEN, 2014a). CoV-Infektionen bei Katzen können asymptomatisch verlaufen oder milde Gastroenteritiden verursachen (KIPAR & MELI, 2014; PEDERSEN, 2014a) oder aber eine schwere systemische Krankheit, die FIP, verursachen. Basierend auf antigenetischen Unterschieden, wird das FCoV in zwei Serotypen unterteilt: FCoV-Typ-I und -Typ-II. FCoV-Typ-I kommen häufiger vor

und sind für 70-95 % der Infektionen verantwortlich (VOGEL et al., 2010, BROWN, 2011). Bleibt die FCoV-Infektion auf Enterozyten beschränkt, wird dieser enterale Biotyp als felines enterales CoV bezeichnet. Verändert sich jedoch durch spezifische Mutationen der Zelltropismus des FCoV, entsteht ein pathogenes Virus, das feline-infektiöse-Peritonitis-Virus (FIPV), das zu einer systemischen und letalen Erkrankung führt (HARTMANN, 2005; KIPAR & MELI, 2014; PEDERSEN, 2014a).

2.1.1. Felines enterales Coronavirus

Das feline enterale Coronavirus (FECV) kann milde Durchfallsymptomatiken bei Katzen hervorrufen. Die Infektion kann aber auch asymptomatisch verlaufen (PEDERSEN et al., 1981; ADDIE et al., 2009).

2.1.1.1. Ätiologie und Epidemiologie

FCoV-Infektionen treten bei Hauskatzen und nahezu allen Wildkatzen auf (ADDIE et al., 2009; BROWN et al., 2009). FCoV sind vor allem in Mehrkatzenhaushalten, Katzensuchten und Tierheimen endemisch, da dort permanent die Möglichkeit einer Reinfektion besteht (HARTMANN, 2005; ADDIE et al., 2009; BROWN et al., 2009). So weisen nur ca. 20 % der Katzen aus Einzelhaltungen oder der Katzen, die als Streuner leben, aber nahezu 100 % der Katzen aus Mehrkatzenhaushalten Antikörper auf (PEDERSEN, 1976a; ADDIE & JARRETT, 1992; PEDERSEN, 1995; BROWN et al., 2009).

2.1.1.2. Pathogenese

Die Infektion mit dem harmlosen FECV findet meist bereits im Welpenalter statt (FOLEY et al., 1997; ADDIE et al., 2009; KIPAR & MELI, 2014). Als infektiös gelten dabei vor allem Kot, aber auch andere Sekrete und Exkrete (HARTMANN, 2005; ADDIE et al., 2009). Bereits zwei Tage nach Infektion kann das Virus im Kot nachgewiesen werden. Die Ausscheidung kann über Wochen bis Monate andauern, manchmal auch lebenslang. Nach oronasaler Aufnahme des FCoV kommt es initial zur Virus-Replikation im Bereich der Tonsillen und der Epithelien

des Oropharynx. Nachfolgend werden die Darmepithelzellen befallen (MAYR & ROLLE, 2007; VOGEL et al., 2010; LE PODER, 2011). Mit FECV infizierte Katzen entwickeln meist keine Symptome. Wenn Symptome auftreten, sind nur milde und meist selbst-limitierende Magen-Darm-Problematiken, wie Anorexie, Erbrechen und Durchfall, zu sehen (PEDERSEN et al., 1981; ADDIE et al., 2009). In einzelnen Fallberichten führten die lokalen Infektionen des Darmes in Ausnahmefällen zu schwerwiegenden, katarrhalischen und hämorrhagischen Enteritiden mit Todesfolge (KIPAR & MELI, 2014).

2.1.1.3. Pathologische Veränderungen

In der pathologischen Untersuchung von symptomatischen Katzen ist eine unterschiedlich ausgeprägte Villiatriophie der Darmschleimhaut, die vom Duodenum bis Ileum reicht, beschrieben (PEDERSEN et al., 1981; KIPAR et al., 1998). Eine Villifusion sowie Abtrennung und Verschorfung der Epithelzellen der Basalmembran sowie eine milde Entzündungsreaktion können zu sehen sein (PEDERSEN et al., 1981; KIPAR et al., 1998).

2.1.2. Felines-infektiöse-Peritonitis-Virus

Durch spezifische Mutationen kann aus dem FECV das FIPV entstehen (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998). Das FIPV führt zu einer systemischen Infektion mit pyogranulomatösen Organveränderungen, die obligat tödlich verläuft (KIPAR & MELI, 2014).

2.1.2.1. Ätiologie und Epidemiologie

Etwa 5–10 % der Katzen in Mehrkatzenhaushalten, die mit dem FCoV infiziert sind, entwickelten FIP (PEDERSEN, 1976a; ADDIE, 2000; HARTMANN, 2005; BROWN et al., 2009; PEDERSEN, 2009). Katzen aller Altersstufen können an FIP erkranken, häufiger tritt die Krankheit jedoch bei Tieren im Alter unter 2 Jahren auf (FOLEY et al., 1997; HARTMANN, 2005; PEDERSEN, 2009; MWASE et al., 2015; RIEMER et al., 2016). Manche Rassen, wie Abessinier, Bengalen, Heilige Birma, Himalayan und Ragdoll, zeigten im Vergleich zu anderen Rassen ein signifikant höheres Risiko, FIP zu entwickeln (NORRIS et al., 2005; BELL et al.,

2006; CARLSON & MACINTIRE, 2006; WORTHING et al., 2012; KIPAR & MELI, 2014; PEDERSEN et al., 2016). Aufgrund dieser rassespezifischen Prädisposition wurde angenommen, dass auch genetische Faktoren eine Rolle bei der Entstehung der FIP spielen (PEDERSEN et al., 2016). GOLOVKO und Mitarbeiter (2013) beobachteten bei einer Inzuchtpopulation von Birma-Katzen einen Zusammenhang zwischen der Empfänglichkeit für FIP und genetischen Faktoren einerseits und dem Alter der Katzen andererseits. Dabei konnten 5 potentielle Gene identifiziert werden, die in die Immunregulation und den Apoptose-Prozess involviert und damit potentiell prädisponierend für die Entwicklung einer FIP waren. Ein 100%iger Zusammenhang zwischen dem Grad der Empfänglichkeit für FIP und dem Phänotyp der erkrankten Katzen konnte allerdings nicht hergestellt werden (GOLOVKO et al., 2013). PEDERSEN und Mitarbeiter (2014) zeigten, dass 36 % der Laborkatzen einer spezifischen Zuchtkolonie resistent gegen eine klinische FIP-Manifestation waren. Der genetische Ursprung dieses Phänomens konnte jedoch nicht gefunden werden (PEDERSEN, 2014a). In einer weiteren Inzuchtstudie wurde eine höhere Empfänglichkeit bestimmter Katzenwelpen für eine experimentell induzierte FIP gesehen, aber auch hier konnte die genetische Grundlage nicht gefunden werden (PEDERSEN et al., 2016).

2.1.2.2. Pathogenese

Die Pathogenese der FIP ist komplex und nach wie vor nicht vollständig geklärt. Das durch Mutation veränderte FCoV, das FIPV, vermehrt sich in Makrophagen (ROTTIER et al., 2005). Dadurch kommt es zu einer systemischen Infektion. Es treten Körperhöhlenergüsse und pyogranulomatöse Veränderungen in verschiedenen Organen, inklusive ZNS und Augen, auf (HARTMANN, 2005; LIESS & MOENNIG, 2010; KIPAR & MELI, 2014). Derzeit gelten drei Schlüsselereignisse als Voraussetzung für die Entwicklung einer FIP (KIPAR & MELI, 2014):

- I) Entstehung hochpathogener FIPV durch Mutation
- II) effektive und permanente FIPV-Replikation in Makrophagen
- III) Aktivierung der FIPV-infizierten Makrophagen

2.1.2.2.1. Mutation

Der virulente Biotyp des FCoV, das FIPV, entsteht in der Katze durch Mutation (HARTMANN, 2005; MYRRHA et al., 2011). Der Ort der Mutationen ist nicht eindeutig geklärt. Vermutlich kommen verschiedene Lokalisationen in Frage. Das nicht-mutierte FCoV, das FECV, repliziert vorwiegend in Darmepithelzellen, dabei bei einer aktiven Infektion vor allem im Bereich des Duodenums bis Zäkums (KIPAR et al., 2010; PEDERSEN et al., 1981; PEDERSEN et al., 2012). Interessanterweise wurde nach experimenteller intraperitonealer Verabreichung des FECV an pathogenfreie Katzen eine FECV-Ausscheidung mit dem Kot nachgewiesen. Daher wird davon ausgegangen, dass FECV sich auch systemisch ausbreiten können, also Makrophagen infizieren und sich über eine Makrophagen-assoziierte Virämie systemisch verbreiten und somit ihrem Enterotropismus folgen können. In den Makrophagen findet allerdings keine bedeutende Replikation statt (DEWERCHIN et al., 2006; KIPAR et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012; KIPAR & MELI, 2014; ROTTIER et al., 2005). Aufgrund der Tatsache, dass sowohl harmlose FECV, als auch virulente FIPV in Makrophagen replizieren können, gingen PEDERSEN und Mitarbeiter (2012) davon aus, dass eher die Makrophagen und nicht die Darmepithelzellen der Ort sein könnte, an dem die entscheidenden Mutationen stattfinden (PEDERSEN et al., 2012).

Derzeit wird angenommen, dass mehrere Mutationen dafür verantwortlich sein können, dass Katzen FIP entwickeln (BATTILANI et al., 2010; DEDEURWAERDER et al., 2013; KIPAR & MELI, 2014; PEDERSEN, 2014a). Eine besondere Bedeutung wird dabei einer Mutation im Gen des S-Proteins zugeschrieben (ROTTIER et al., 2005; DEDEURWAERDER et al., 2013; KIPAR & MELI, 2014). In einer Studie wurden bei über 95 % der Katzen mit FIP, nach Sequenzierung und phylogenetischer Analyse mehrerer Isolate, zwei verschiedene Mutationen im Bereich des Gens des S-Proteins entdeckt (CHANG et al., 2012; KIPAR & MELI, 2014). In derselben Studie wurde diese Mutation bei den gesunden Katzen nicht nachgewiesen. Mutationen im S-Protein führen zur Unfähigkeit, an Enterozyten zu binden. Dabei liegen diese Mutationen nicht im Gen des Rezeptorbindungsproteins S1, sondern in der membranproximalen S2-Domäne, welche für die Membranfusion des Virus mit der Zielzelle verantwortlich ist (ROTTIER et al., 2005; KIPAR & MELI, 2014). Diese Annahme wurde damit belegt, dass eine Deletion im Gen des S1-Proteins keinen Einfluss auf die Fähigkeit

des Virus hatte, von Makrophagen aufgenommen zu werden (TAKANO et al., 2011). Demgegenüber wurde durch Mutation im Bereich des Gens des S2-Proteins die Aufnahme des Virus in Makrophagen erheblich gefördert (KIPAR & MELI, 2014). In Tabelle 3 sind die Funktionen der Strukturproteine und der NSP der FCoV und die Auswirkung auf die Pathogenität zusammengefasst (Tab. 3).

Tabelle 3: Struktur- und Nichtstrukturproteine der feline Coronaviren mit Funktion und Auswirkung auf die Entstehung der FIP.

In Anlehnung an KIPAR & MELI, 2014. Mit freundlicher Genehmigung von SAGE Publications (Lizenzvereinbarung, 31. August 2017).

S: Spikeprotein; S1: Anteil des Spikeproteins, das für den Zelltropismus und die Bindung an die Zielzelle verantwortlich ist; S2: Anteil des Spikeproteins, das für die Zellfusion sorgt; E: Hüllprotein; M: Membranprotein; N: Nukleokapsidprotein; 3a-c und 7a-b: nicht-Strukturproteine; BMDM: Makrophagen aus dem Knochenmark (bone marrow-derived macrophages).

Protein/ Lokalisation	Funktion	Rolle bei der Entstehung von FIP (in-vitro- und in-vivo-Studien)
S	Aufnahme in Zielzelle (Makrophagentropismus) (ROTTIER et al., 2005)	Mutationen in der Region zwischen S1 und S2 werden mit FIP in Verbindung gebracht (LICITRA et al., 2013)
S1	Rezeptorbindung (BOSCH et al., 2003)	Mutationen haben keinen Effekt auf die Pathogenität (TAKANO et al., 2011)
S2	Fusionspeptid (BOSCH et al., 2003)	spezifische Mutationen sind häufig mit FIP assoziiert (CHANG et al., 2012)
E	Reifung, Zusammenbau, Budding und Interaktion mit Zielzelle (DYE et al., 2005)	Mutationen haben keinen Effekt auf die virale Replikation in BMDM (ROTTIER et al., 2005)
M	Reifung, Zusammenbau, Budding und Interaktion mit Zielzelle des Virus (DYE et al., 2005)	Mutationen haben keinen Effekt auf die virale Replikation in BMDM (ROTTIER et al., 2005)

Tabelle 3: Fortsetzung.

Protein/ Lokalisation	Funktion	Rolle bei der Entstehung von FIP (in-vitro- und in-vivo-Studien)
N	virale Transkription (OLSEN et al., 1993)	Mutationen haben keinen Effekt auf die virale Replikation in BMDM (ROTTIER et al., 2005) Mutationen inhibieren die Immunantwort (BATTILANI et al., 2010)
ORF-3a	keine spezifische Funktion beschrieben (KIPAR & MELI, 2014)	Mutationen haben keinen Effekt auf die virale Replikation in BMDM (ROTTIER et al., 2005)
ORF-3b	keine spezifische Funktion beschrieben (KIPAR & MELI, 2014)	Mutationen haben keinen Effekt auf die virale Replikation in BMDM (ROTTIER et al., 2005) Mutationen blockieren die virale Replikation in Makrophagen (DEDEURWAERDER et al., 2013)
ORF-3c	Replikation in Enterozyten und damit Virusausscheidung über den Kot (KIPAR & MELI, 2014)	Mutationen verhindern die kontinuierliche Infektion von Enterozyten (VENNEMA et al., 1998; CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012) Mutationen werden häufig bei Katzen mit FIP gefunden, sind aber nicht alleine für die Entstehung der FIP verantwortlich (PEDERSEN et al., 2012) Mutationen führen zum Stop der Virusausscheidung (PEDERSEN et al., 2012)

Tabelle 3: Fortsetzung.

Protein/ Lokalisation	Funktion	Rolle bei der Entstehung von FIP (in-vitro- und in-vivo-Studien)
ORF-7	Interaktion mit dem Immunsystem (BATTILANI et al., 2010)	Mutationen haben keinen Effekt auf die virale Replikation in BMDM (ROTTIER et al., 2005) Mutationen führen zu einer geringeren, aber kontinuierlicheren Replikation in Makrophagen (DEDEURWAERDER et al., 2013)
ORF-7a	Interferon-Antagonist (DEDEURWAERDER et al., 2013)	Mutationen führen zu einer Hemmung der initialen zellulären Immunantwort der Katze (KENNEDY et al., 2001)
ORF-7b	Antikörperinduktion (HERREWEGH et al., 1995a)	Mutationen haben keinen Effekt auf die virale Replikation in BMDM (ROTTIER et al., 2005) Mutationen führen zur Reduktion der Virulenz (TAKANO et al., 2011) Mutationen führen gegebenenfalls zur Neutralisierung der initialen Immunantwort (DEDEURWAERDER et al., 2013)

Es wird derzeit angenommen, dass eine Mutation im Bereich des Gens des S-Proteins nicht allein für die Entstehung einer FIP verantwortlich ist (DEDEURWAERDER et al., 2013). Grund für diese Annahme ist die hohe Mutationsrate des Virus und das im Verhältnis dazu doch relativ seltene Auftreten der FIP (KIPAR & MELI, 2014).

Neben dem S-Protein können auch andere Proteine durch Mutationen verändert sein. So sind Mutationen im Gen des N-Proteins beschrieben (BATTILANI et al.,

2010; KIPAR & MELI, 2014). Das N-Protein soll eine Rolle bei der Stimulation der zellulären Immunität spielen. Die Immunantwort des Patienten kann durch eine Mutation im Gen des N-Proteins vermindert oder gar ganz verhindert werden (BATTILANI et al., 2010). Weitere Studien wiesen Mutationen im Bereich ORF-3c des FCoV in Geweben und Organen von Katzen mit FIP nach (DEDEURWAERDER et al., 2013; KIPAR & MELI, 2014). Demgegenüber besaßen nahezu alle FECV aus dem Kot von Katzen mit einer enteralen Infektion ein intaktes ORF-3c (CHANG et al., 2012; PEDERSEN et al., 2012). Der Bereich ORF-3c von FCoV gesunder Katzen und von Katzen mit FIP wurde auch in einer weiteren Studie untersucht. Von 32 Katzen mit FIP konnte bei 60 % der Viren eine Mutation im ORF-3c mit teilweise Funktionsverlust des entsprechenden Proteins nachgewiesen werden (PEDERSEN et al., 2012), nicht alle FIPV wiesen jedoch eine Mutation in diesem Bereich auf (CHANG et al., 2010).

Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Mutationen wird gefördert durch eine hohe Virusreplikation. Diese wiederum wird durch Faktoren, wie erhöhtes Reinfektionsrisiko in Mehrkatzenhaushalten, Stress, geringes Alter, Immundefizienz und Glukokortikoidapplikation, beeinflusst (HARTMANN, 2005; ADDIE et al., 2009; KIPAR & MELI, 2014). Bei hoher Virusreplikation steigt aufgrund der höheren Mutationswahrscheinlichkeit auch die Wahrscheinlichkeit, eine FIP zu entwickeln (HARTMANN, 2005).

2.1.2.2.2. Virusreplikation in Makrophagen

Neben der Veränderung des Zelltropismus des FCoV durch Mutation ist auch die massive und permanente Replikation des Virus in den Makrophagen für das Auftreten der FIP entscheidend (Tab. 3). Es wird diskutiert, dass hierfür weitere Mutationen verantwortlich sind (DEDEURWAERDER et al., 2013; KIPAR & MELI, 2014). In einer Studie von DEDEURWAERDER und Mitarbeitern (2013) wurde die Relevanz von den Bereichen ORF-3 und ORF-7 im Hinblick auf die Replikation des FCoV in Makrophagen untersucht. Von genetisch modifizierten Viren mit einer Deletion des ORF-3abc (FIPV- 3), ORF-7ab (FIPV- 7) oder mit einer Deletion an beiden Domänen (FIPV- 3 7) zeigten FIPV- 3 eine geringere Replikationsfähigkeit als FIPV- 7. FIPV- 7 waren in der Lage, einen Replikationszyklus in Makrophagen zu beenden (DEDEURWAERDER et al.,

2013).

PEDERSEN (2009) beschrieb, dass die Virusreplikation in Makrophagen in den ersten zwei Wochen nach Mutation des FCoV nur langsam abzulaufen scheint (PEDERSEN, 2009). Von Tag 10 bis 21 nimmt die Aufnahme von Virus in Makrophagen und die FCoV-Replikation in den Makrophagen massiv zu. Ebenso nimmt die Makrophageninfiltration in Organläsionen massiv zu. Gleichzeitig beginnt die Antikörperbildung gegen das FCoV (PALTRINIERI et al., 2003; PEDERSEN, 2009; KIPAR & MELI, 2014). Folge der massiven Virusreplikation ist die Aktivierung der FIPV-enthaltenden Makrophagen und letztendlich deren Zerstörung mit Freisetzung von Zytokinen, wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6 und Tumornekrosefaktor- (TNF-) und weiterer Entzündungsmediatoren. Aufgrund der Freisetzung von Adhäsionsmolekülen (aus den aktivierten Makrophagen, B- und T-Lymphozyten und Granulozyten), wie zum Beispiel CD 18, können sich Makrophagen, die das FIPV enthalten, sowie neutrophile Granulozyten und Lymphozyten und teilweise auch Plasmazellen, an Gefäßen und Geweben festsetzen. Dadurch entstehen, unter Beteiligung von Enzymen wie Metalloproteasen, die eine erhöhte vaskuläre Permeabilität verursachen, Gefäßwandschädigungen und granulomatöse Phlebitiden und Periphlebitiden sowie pyogranulomatöse Organveränderungen (KIPAR & MELI, 2014).

2.1.2.2.3. Immunantwort

Die Immunantwort auf die Infektion spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese einer FIP. Nicht das Virus an sich verursacht letztendlich die schwerwiegenden Läsionen, sondern die Reaktion des Immunsystems der Katze auf das FIPV führt zu dem fatalen Verlauf der FIP (HARTMANN, 2005). Es wird diskutiert, ob eine Imbalance zwischen der zellulären und der humoralen Immunantwort eine potentielle Rolle in der Entstehung der FIP spielt (PEDERSEN, 2014a). So wurde früher angenommen, dass eine frühe zellvermittelte Immunität die Entstehung von FIP verhindern könnte (PALTRINIERI et al., 2003; DE GROOT-MIJNES et al., 2005; KIPAR & MELI, 2014).

Während der Vermehrung des FIPV in Makrophagen werden die Regionen ORF-7a und -7b des Virusgenoms, aufgrund ihrer randständigen Lokalisation am 3'-

Ende des Genoms, sehr früh gebildet. Aus diesem Grund wird angenommen, dass diese beiden Regionen für die Neutralisierung der initialen Immunantwort der Katze auf das FCoV in der frühen Phase der Entwicklung der FIP verantwortlich sind (DEDEURWAERDER et al., 2013). ORF-7a fungiert dabei als ein Interferon-Antagonist und schützt das FIPV vor dem Immunsystem der Katze (DEDEURWAERDER et al., 2013; PEDERSEN, 2014a). Eine erste Reaktion des Immunsystems der Katzen auf FCoV-infizierte Zellen ist die Freisetzung von Interferonen, die einen antiviralen Status der Zellen bewirken (GOODBOURN et al., 2000, PALTRINIERI et al., 2003; DE GROOT-MIJNES et al., 2005; KIPAR & MELI, 2014). Es wird diskutiert, dass eine Aktivierung der T-Zell-Immunität durch Interferon- γ in der Lage ist, Katzen vor der Entwicklung einer FIP zu schützen (PEDERSEN, 2014a). Katzen, denen experimentell mutierte FIPV übertragen wurden, die aber keine Symptome entwickelten, zeigten im Gegensatz zu den Katzen, die an den Symptomen der FIP starben, eine verstärkte Produktion von Interferon- γ (SATO et al., 2011). GELAIN und Mitarbeiter (2006) fanden heraus, dass bei Katzen mit FIP zum Todeszeitpunkt Interferon- γ -mRNA kaum noch vorhanden war oder gar nicht mehr nachgewiesen werden konnte (GELAIN et al., 2006). In anderen Studien konnte allerdings demgegenüber bei Katzen mit FIP eine erhöhte lokale Interferon- γ -Expression in den Läsionen gefunden werden (BERG et al., 2005; FOLEY et al., 2003). Eine starke Depletion von natürlichen Killerzellen und regulatorischen T-Zellen sowie eine reduzierte zytotoxische Aktivität der natürlichen Killerzellen können ebenso im Endstadium der FIP nachgewiesen werden (PEDERSEN, 2014b). Durch eine insuffiziente zelluläre Immunantwort kann das Immunsystem nicht adäquat auf die FIPV-Infektion reagieren (PEDERSEN, 2014b).

Werden Katzen mit FCoV infiziert, reagiert der Organismus mit einer humoralen Immunantwort und bildet Antikörper gegen das FCoV. Früher nahm man an, dass die Bildung hoher Antikörperkonzentrationen gegen das S-Protein und ein hohes S:M-Antikörper-Verhältnis dazu führen, dass das FCoV eliminiert und dadurch die Entwicklung einer FIP verhindert werden kann (GONON et al., 1999; PEDERSEN, 2009). Allerdings weiß man heute, dass auch hohe Antikörperkonzentrationen nicht in der Lage sind, das Virus zu beseitigen (KIPAR & MELI, 2014). Eine starke humorale Immunantwort führt vielmehr zu einer massiveren klinischen Ausprägung, oft mit Bildung von Körperhöhlenergüssen

(PEDERSEN, 2009). Eine Erklärung, warum Antikörper FIPV nicht eliminieren können, ist die Inhibition der komplementmedierten Lyse FIPV-infizierter Zellen durch das Virus (CORNELISSEN et al., 2009; DEWERCHIN et al., 2008). Zudem wurde gezeigt, dass in vitro FIPV-infizierte Zellen nur unregelmäßig Virus auf der Oberfläche präsentieren (DEWERCHIN et al., 2005). Aus pyogranulomatösen Läsionen von FIPV-infizierter Katzen gewonnene Zellen präsentierten sogar kein Virus auf ihrer Oberfläche (CORNELISSEN et al., 2007). Auch wenn die infizierten Zellen virales Antigen auf ihrer Oberfläche präsentieren, verhindert das FIPV die Zerstörung dieser Zellen (CORNELISSEN et al., 2009; DEWERCHIN et al., 2006; DEWERCHIN et al., 2008). Der zugrundeliegende Mechanismus hierfür ist noch nicht vollständig geklärt (CORNELISSEN et al., 2009).

Da im Verlauf der FIP Antigen-Antikörper-Komplexe entstehen, ging man lange Zeit davon aus, dass der Pathogenese von FIP eine Typ-III-Überempfindlichkeitsreaktion zugrunde liegt (FOLEY et al., 2003; KIPAR & MELI, 2014). Diese Hypothese basierte auf Untersuchungen mittels der Immunfluoreszenz, die Leukozyten, zellfreies Fibrinogen und der Komplementfaktor C3, sowie Virusantigen, Immunglobulin G und weitere Komplementfaktoren in den pyogranulomatösen Entzündungen darstellte (PETERSEN & BOYLE, 1980; WEISS & SCOTT, 1981b; JACOBSE-GEELS, 1982; PALTRINIERI et al., 1998; KIPAR & MELI, 2014). Immunkomplexe konnten allerdings nicht nur bei Katzen mit FIP, sondern auch bei FECV-infizierten Katzen, die gesund bleiben, nachgewiesen werden (KIPAR et al., 1998; KIPAR & MELI, 2014). Gegen die Theorie einer Typ-III-Überempfindlichkeitsreaktion spricht, dass die typische Vaskulitis, wie sie bei einer FIP zu sehen ist, keine Hinweise für eine Immunkomplexvaskulitis, die typischerweise mit einer Involvierung von Arterien oder neutrophile Granulozyten als dominierendes Zellbild einhergeht, zeigt (KIPAR et al., 2005).

In experimentellen Studien wurde das Phänomen des „antibody dependent enhancement“ (ADE) beschrieben, also die Bildung von infektionsverstärkenden Antikörpern. Dieses Phänomen tritt nach Impfungen mit rekombinanten Viren auf (KIPAR & MELI, 2014). ADE basiert auf einer verstärkten Aufnahme von Virus und Antikörpern gegen das S-Protein in Makrophagen über fragment-crystallisable-Rezeptoren (Fc-Rezeptoren). Dadurch kann das FIPV schnell im Körper verbreitet werden. Unter Feld-Bedingungen scheint ADE aber keine Rolle zu spielen

(HARTMANN, 2005; MEURER & WOLF, 2007; ADDIE, 2012; KIPAR & MELI, 2014).

2.1.2.3. Pathologische Veränderungen

Bereits im Jahre 1960 wurde bei Katzen mit FIP eine Peritonitis als Hauptmerkmal der Erkrankung definiert (HOLZWORTH, 1963). Aus diesem Grund nannte HOLZWORTH (1963) die Erkrankung „chronische fibrinöse Peritonitis“ (HOLZWORTH, 1963; KIPAR & MELI, 2014).

2.1.2.3.1. Makroskopie

Charakteristisch für FIP sind eine fibrinöse und granulomatöse Serositis, proteinreiche Körperhöhlenergüsse sowie pyogranulomatöse Läsionen (KIPAR & MELI, 2014). Die Pyogranulome können in allen Organen vorkommen und sowohl groß und gut abgegrenzt mit zentralem Nekroseherd sein als auch in Form zahlreicher kleiner Herde auftreten (KIPAR & MELI, 2014). Die Verteilung dieser Läsionen variiert (KIPAR et al., 1998; KIPAR et al., 1999; PEDERSEN, 2009). Je nach Studie war bei bis zu 75 % der Fälle das Peritoneum betroffen. Bei 69 % der Tiere wurden Körperhöhlenergüsse nachgewiesen (PEDERSEN, 2009; KIPAR & MELI, 2014). In Untersuchungen von NORRIS und Mitarbeiter (2005) konnten bei 45 % der Katzen mit FIP Körperhöhlenergüsse dargestellt werden (NORRIS et al., 2005). Große intraabdominale Massen durch pyogranulomatöse Organveränderungen wurden bei 20 % aller Katzen gesehen (LEWIS & O'BRIEN, 2010). In der Studie von NORRIS und Mitarbeitern (2005) lag der Anteil der Katzen mit palpierbaren vergrößerten abdominalen Organen bei 48 % (NORRIS et al., 2005). Die typische Vaskulitis betraf in einer Studie von KIPAR und Mitarbeitern (2005) vor allem kleine oder mittelgroße Venen in Leptomeningen, Nierenrinde, Augen und seltener auch in Lunge und Leber (KIPAR et al., 2005).

Läsionen im ZNS stellten sich als Verdickungen und Trübungen der Meningen vor allem im ventralen Bereich des Gehirns dar (FOLEY et al., 1998). Auch im ZNS treten typische, meist oberflächenassoziierte, pyogranulomatöse Veränderungen auf. Die Läsionen im Gehirn reichen von einer milden Infiltration des Ependyms mit hauptsächlich Lymphozyten und Makrophagen bis zu einer massiven

Ependymverdickung durch histiozytäre und lymphozytäre Infiltrationen, periventrikulärer Vaskulitis, periventrikulärer Astrozytose und zell- und proteinreicher, entzündlicher Exsudation. Aufgrund des hohen Eiweißgehalts kann ein obstruktiver Hydrozephalus entstehen (FOLEY et al., 2001, FOLEY et al., 1998).

2.1.2.3.2. Histologie

Histologisch dominieren Phlebitis und Periphlebitis. Weiterhin können Nekrosen mit perivaskulärer Infiltration mit Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen und polymorphnukleären neutrophilen Granulozyten gesehen werden (MEURER & WOLF, 2007; KIPAR & MELI, 2014).

Im ZNS wurden eine Meningitis, eine Ependymitis, eine Periventrikulitis und eine choroidale Plexitis beschrieben. Der Schweregrad der Entzündung variierte dabei, und der entzündliche Prozess war meist oberflächlich und periventrikulär lokalisiert. Das Zellbild im entzündlichen Gebiet beinhaltete vor allem Lymphozyten, Plasmazellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen (SLAUSON & FINN, 1972; TAMKE et al., 1988; FOLEY et al., 1998). Die Meningitis war in einer Studie von FOLEY und LEUTENEGGER (2001) vor allem auf der ventrokaudalen Oberfläche des Gehirns (Kleinhirn, Hirnstamm), inklusive Medulla oblongata, ausgeprägt (FOLEY & LEUTENEGGER, 2001). Leukozyten wurden vor allem im perivaskulären Gebiet im Zusammenhang mit Periarteritis, Phlebitis, aktivierten Astrozyten mit Produktion von zell- und proteinreichen Ödemen vorgefunden (SLAUSON & FINN, 1972; FOLEY & LEUTENEGGER, 2001). Ein Hydrozephalus konnte in Verbindung mit Leptomeningitis, meningealer Fibrose, akkumulierendem Zelldetritus und Obstruktion des Liquorflusses aufgrund des hohen Proteingehalts des Liquors vorhanden sein (FOLEY & LEUTENEGGER, 2001).

2.1.2.3.3. Immunfärbungen

Eine immunhistochemische Färbung betroffener Organe gilt als Goldstandard in der Diagnose der FIP (FOLEY et al., 1998; HARTMANN, 2005; KIPAR & MELI, 2014). Alternativ können Immunfluoreszenzfärbungen, welche gefrorene

Gewebeproben benötigten, oder Immunperoxidasefärbungen, welche an Formalinfixierten Proben durchgeführt werden, FIP bestätigen (PEDERSEN, 2014a). Die Sensitivität der IHC hängt von der Qualität der verwendeten Reagenzien, von der Qualität der Gewebeprobe oder der Biopsien oder des Körperhöhlenergusses sowie vom Vorhandensein von Läsionen innerhalb der Gewebeprobe und von der Kompetenz der versuchsdurchführenden und mikroskopierenden Person ab. Die Spezifität der IHC gilt als 100 %.(GIORI et al., 2011; PEDERSEN, 2014a). Als Antikörper wird der monoklonale Antikörper FIPV3-70 verwendet (FOLEY et al., 1998).

2.2. Coronavirusinfektionen der Frettchen

Beim Frettchen wurden drei verschiedene Erkrankungen beschrieben, die durch CoV verursacht werden: das schwere akute respiratorische Syndrom (SARS), die epizootische katarrhale Enteritis (ECE) und die Infektion mit dem systemischen Coronavirus der Frettchen (FrSCoV) (DOMINGUEZ et al., 2011). SARS-CoV konnten bei Frettchen bisher nur experimentell übertragen werden und eine Infektion ist im Feld noch nicht beschrieben (DOMINGUEZ et al., 2011; CAMERON et al., 2012). Wie beim Menschen befällt das SARS-CoV nach experimenteller Infektion beim Frettchen vor allem den Atmungsstrakt. Es führt zu milden respiratorischen Symptomen (GARNER et al., 2008; VAN DEN BRAND et al., 2008; GRAHAM et al., 2013). Da bisher keine natürlichen SARS-CoV-Infektionen bei Frettchen auftraten, wird im Folgenden nur auf die ECE und die Infektion mit dem FrSCoV näher eingegangen.

2.2.1. Enterales Coronavirus der Frettchen

Die ECE stellt eine kontagiöse Erkrankung der Frettchen dar, die mit Symptomen einer Gastroenteritis einhergeht (MURRAY et al., 2010). Diese Erkrankung bei Frettchen wurde zum ersten Mal im Jahre 1993 an der Westküste der Vereinigten Staaten nachgewiesen (WILLIAMS et al., 2000).

2.2.1.1. Ätiologie und Epidemiologie

Im Jahre 1993 wurde mittels Elektronenmikroskopie und Immunhistochemie gezeigt, dass ein CoV für die ECE, nämlich das enterale Coronavirus der Frettchen (ferret enteric coronavirus, FrECoV), verantwortlich ist (WILLIAMS et al., 2000). Das FrECoV gehört ebenso wie das FCoV zur Gruppe 1 des Genus Alphacoronavirus (Tab. 1).

Bei der ECE handelt es sich um eine hoch kontagiöse Erkrankung bei Frettchen, die mit einer Gastroenteritis einhergeht (WILLIAMS et al., 2000; MURRAY et al., 2010). Das Durchschnittsalter infizierter Frettchen beträgt 4 Jahre. Ältere Frettchen entwickeln schwerwiegendere Symptome als Jungtiere, bei denen die Infektion meist subklinisch verläuft (WILLIAMS et al., 2000; MURRAY et al., 2010).

In einer Studie von VLASOVA und Mitarbeitern (2007) wurde die Verbreitung des FrECoV bei Frettchen in den Niederlanden untersucht (VLASOVA et al., 2007). Dabei wurden 85 asymptomatische Frettchen auf Antikörper gegen das FrECoV getestet. Zusätzlich wurde eine RT-PCR von Rektaltupferproben durchgeführt, um virale RNA nachzuweisen. Von den untersuchten Frettchen wiesen 32 % Antikörper gegen das Virus auf, und bei 42 % der Tiere war die RT-PCR positiv. In einer weiteren Studie wurde Kot von 90 Frettchen mittels RT-PCR untersucht. In dieser Untersuchung waren 61 % der Kotproben positiv (PROVACIA et al., 2011).

2.2.1.2. Pathogenese

Die Pathogenese der ECE ist der einer FCoV-Infektion der Katzen ähnlich. Das Virus wird über den Kot infizierter Frettchen ausgeschieden und von anderen Frettchen oral aufgenommen. Danach kommt es zur Infektion der Enterozyten (WILLIAMS et al., 2000). Die Folgen können Enteritiden mit gastrointestinalen Symptomen und Dehydratation sein, die zum Tode führen können (WILLIAMS et al., 2000). Asymptomatische Infektionen sind häufig (PROVACIA et al., 2011).

2.2.1.3. Pathologische Veränderungen

In der pathologischen Untersuchung von Frettchen mit ECE kann eine

hyperämische Veränderung des betroffenen Darmabschnittes gesehen werden. Die Darmwand erscheint zudem sehr dünn (MURRAY et al., 2010). In der mikroskopischen Untersuchung fällt eine diffuse lymphozytäre Enteritis mit Villiatriphie sowie Villifusion und Villischrumpfung auf. Weiterhin kann es zu einer vakuolären Degeneration und zur Nekrose des apikalen Epithels kommen (WILLIAMS et al., 2000). Durch immunhistochemische Untersuchungen des Darmes mit dem monoklonalen Antikörper FIPV3-70 können FrCoV nachgewiesen werden (MURRAY et al., 2010).

2.2.2. Systemisches Coronavirus der Frettchen

FrECoV-Infektionen beim Frettchen gehören zu den wenigen CoV-Infektionen, die wie bei der Katze nach Mutation des Virus zu einer systemischen Infektion führen können (MURRAY et al., 2010). Bisher ist allerdings unbekannt, ob das FrSCoV de novo im Frettchen durch eine Mutation aus dem FrECoV entsteht, so wie dies bei der FCoV-Infektion der Katze der Fall ist, oder ob es aus einer Rekombination des FrECoV mit einem anderen CoV resultiert und von Frettchen zu Frettchen übertragen wird (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998; WISE et al., 2010). Durch pyogranulomatöse Organveränderungen („FIP-like disease“) kann diese Erkrankung letztendlich zum Tode führen (MURRAY et al., 2010; DOMINGUEZ et al., 2011).

2.2.2.1. Ätiologie und Epidemiologie

FrSCoV wurde erstmals 2004 in Spanien und kurz darauf auch in den USA beschrieben (MARTINEZ et al., 2006; GARNER et al., 2008). Die an einer FrSCoV-Infektion erkrankten Frettchen sind meist unter 18 Monate alt, wobei das Alter der betroffenen Tiere zwischen 2 und 36 Monaten variierte. Infektionen wurden größtenteils bei weiblichen Frettchen nachgewiesen, was höchstwahrscheinlich an der präferierten Haltung weiblicher Tiere liegt (GARNER et al., 2008; MURRAY et al., 2010). Die FrSCoV-Infektion führt zu einer letalen Erkrankung (GARNER et al., 2008). GARNER und Mitarbeiter (2008) untersuchten die Überlebenszeit von 23 Frettchen mit typischen Symptomen und immunhistochemisch bestätigter FrSCoV-Infektion. Alle Frettchen starben

zwischen 1 Tag und 195 Tagen an den Folgen der Erkrankung. Die mittlere Überlebenszeit lag bei 69 Tagen (GARNER et al., 2008).

Der genetische Aufbau des FrSCoV enthält vereinzelte Unterschiede zu dem Aufbau andere CoV. Analysen des FrSCoV zeigten, dass dieses Virus ein ORF-7b-Gen enthält, aber kein ORF-7a-Gen. Anstelle des ORF-7a-Gens, welches bei FCoV vorkommt, wurde ein Pseudogen (3x-Gen) identifiziert (Abb. 6) (WISE et al., 2006). Pseudogene sind RNA-Abschnitte, die über Mutationsprozesse zwar dem Aufbau von Genen ähneln, aber nicht mehr für ein funktionelles Protein kodieren (TUTAR; 2012). In einer Studie wurde ein solches Pseudogen auch bei caninen CoV gefunden. Die Pseudogene der caninen CoV und des FrSCoV stimmten aber nur zu 24 % überein (WISE et al., 2006). Dieses 3x-Gen ist zudem an einer anderen Stelle im FrSCoV-Genom verglichen mit dem caninen CoV-Genom lokalisiert, wobei es sich hierbei auch nur um ein Strang-spezifisches Merkmal des untersuchten Virus gehandelt haben könnte (WISE et al., 2006). Da CoV für ihre hohe Rekombinations-, Insertions- und Deletionsrate bekannt sind, ist das 3x-Pseudogen höchstwahrscheinlich das Resultat eines Insertionsereignisses (LAI, 1992; PASTERNAK et al., 2006; WISE et al., 2006; WOO et al., 2010).

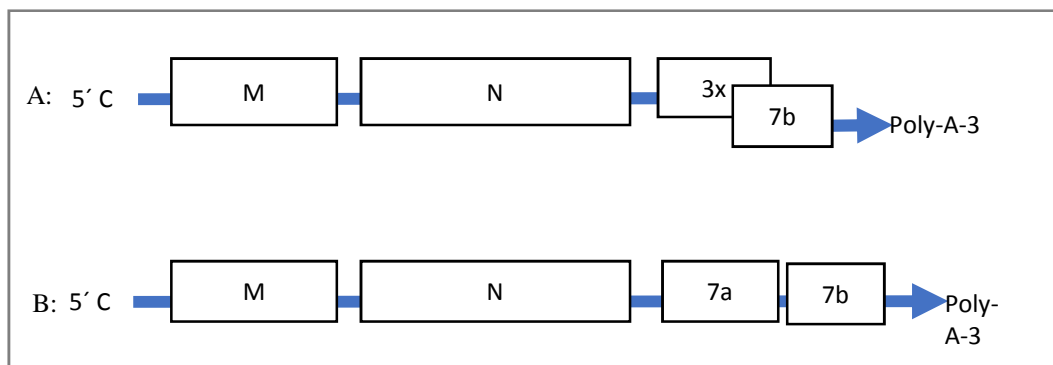


Abbildung 6: Genetischer Aufbau des systemischen Frettchen-Coronavirus und des felines Coronavirus.

In Anlehnung an WISE et al., 2006. Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags (Lizenzvereinbarung, 03. September 2017).

A: systemisches Coronavirus der Frettchen (FrSCoV); B: felines Coronavirus (FCoV).

M: Membranprotein; N: Nukleokapsidprotein; C: Cap-Struktur; 3x: nicht-Strukturprotein; 7b: nicht-Strukturprotein; Poly-A: polyadenyliertes Ende.

Das letale FrSCoV der Frettchen entsteht entweder durch eine in-vivo-Mutation aus

dem FrECoV oder aus Rekombination des FrECoV mit einem anderen Coronavirus der Gruppe 1 (Tab. 1) (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998; WISE et al., 2010). In letzterem Fall würde das FrSCoV als eigenständiges Virus in der Frettchenpopulation zirkulieren. Hierfür würde die hohe Sequenzdifferenz des S-Proteins zwischen dem FrECoV und dem FrSCoV mit einer Übereinstimmung von nur 76 % sprechen (WISE et al., 2010). Bislang gibt es keine Prävalenzdaten aus großen Populationen, sondern nur Fallberichte. Die Prävalenz scheint aber seit dem ersten Fallbericht vor 10 Jahren zu steigen (MARTINEZ et al., 2006; WISE et al., 2006; GARNER et al., 2008; MARTINEZ et al., 2008; MICHIMAE et al., 2010; WISE et al., 2010; DOMINGUEZ et al., 2011; GRAHAM et al., 2012; AUTIERI et al., 2015).

2.2.2.2. Pathogenese

Die Pathogenese der FrSCoV-Erkrankung ist noch nicht völlig geklärt. Bisher vorliegende Informationen basieren auf klinischen Beobachtungen, pathologischen Untersuchungen und genetischen Analysen (MURRAY et al., 2010). FrSCoV-Antigen kann immunhistochemisch im Zytoplasma von Makrophagen nachgewiesen werden (DORIA-TORRA et al., 2016). Somit weißt das FrSCoV einen anderen Zelltropismus auf als das FrECoV. Dieser Unterschied des Zelltropismus schreibt man einer Mutation im Gen des S-Proteins zu (WISE et al., 2010).

Die Infektion mit dem FrSCoV verursacht eine immunmedierte, systemische Erkrankung mit der Bildung einer pyogranulomatösen Entzündung. Typ-III- und Typ-IV-Überempfindlichkeitsreaktionen scheinen dabei für die Entstehung der pyogranulomatösen Läsionen verantwortlich zu sein (DORIA-TORRA et al., 2016). Diese pyogranulomatösen Veränderungen können in jeglichen Organen auftreten, inklusive Zentralnervensystem und Augen (GARNER et al., 2008; DOMINGUEZ et al., 2011). Die Symptome hängen dabei ab, welches Organsystem betroffen ist. Die typische Vaskulitis, wie sie bei Katzen mit FIP zu sehen ist, die aufgrund einer Monozytenaktivierung und der Aktivierung von Endothelzellen zustande kommt, scheint bei Frettchen seltener vorzukommen und daher eine untergeordnete Rolle zu spielen (KIPAR et al., 1998; DORIA-TORRA et al., 2016). In einer Studie von DORIA-TORRA und Mitarbeitern (2016) wurde eine Vaskulitis

nur bei einem Frettchen in meningealen Venen in Form von granulomatöser Phlebitis nachgewiesen (DORIA-TORRA et al., 2016). Da eine Vaskulitis bei Frettchen selten vorkommt, entwickeln Frettchen mit einer FrSCoV-Infektion anders als Katzen mit FIP keine Körperhöhlenergüsse (GARNER et al., 2008; MURRAY et al., 2010). Erkrankte Frettchen werden meist mit abdominalen Umfangsvermehrungen aufgrund großer Pyogranulome und Lymphadenopathien, jedoch ohne Fieber vorgestellt (DOMINGUEZ et al., 2011; GRAHAM et al., 2012).

2.2.2.3. Pathologische Veränderungen

Die pathologische Untersuchung von Organen FrSCoV-infizierter Frettchen zeigt ähnliche Veränderungen wie die von Katzen mit FIP (GARNER et al., 2008; MURRAY et al., 2010). Auf der Serosa sind gefäßassoziierte, multifokale weißliche Knoten und Plaques zu sehen. Häufig sind dabei das Peritoneum, die intestinale Serosa und das Mesenterium verändert. Das Mesenterium ist dann durch die Knoten und Plaques irregulär verdickt. Ähnliche Knoten sind auf den Oberflächen von Organen, wie Leber, Nieren und Lunge, zu sehen. Die Morphologie der pyogranulomatösen Organveränderungen ist identisch zu denen einer FIP. Viruspartikel und Zellen des Immunsystems sind in den Läsionen enthalten (KIPAR & MELI, 2014; DORIA-TORRA et al., 2016). In bisherigen Untersuchungen zeigten mehr als 64 % der an einer FrSCoV-Infektion erkrankten Frettchen große Pyogranulomen in verschiedenen Organen, die sich wie tumorähnliche Umfangsvermehrungen darstellten (GARNER et al., 2008; DOMINGUEZ et al., 2011). In der Regel sind die mesenterialen Lymphknoten betroffen, die bis zu ihrer achtfachen Größe anwachsen und aufgrund der Knoten ebenfalls eine irreguläre Oberfläche aufweisen können (MURRAY et al., 2010). In einer Studie von DOMINGUEZ und Mitarbeitern (2011) hatten nahezu alle Frettchen veränderte Lymphknoten (DOMINGUEZ et al., 2011). Typische Lymphknotenveränderungen bei Frettchen mit einer FrSCoV-Infektion sind nekrogranulomatöse Lymphadenitiden mit multifokaler bis konfluierender Nekrose und histiozytärer, neutrophiler und geringgradiger lymphoplasmatischer Infiltration, die oft als palpierbare Massen identifiziert werden (GRAHAM et al., 2012). Veränderungen im Zentralnervensystem sind bei FrSCoV-Infektionen selten. Es kann unter anderem zur Trübung der Meningen im Bereich der Medulla

oblongata und des Plexus choroideus des vierten Ventrikels kommen (MURRAY et al., 2010).

In der histologischen Untersuchung weisen die Läsionen eine charakteristische pyogranulomatöse Entzündung auf, die vorwiegend am Mesenterium und an den peritonealen Oberflächen auftritt. Die granulomatöse Entzündung betrifft vor allem die Oberfläche des Darms, kann sich aber von der Serosa auf die Lamina muscularis ausdehnen. Beim Frettchen werden vier Granulomtypen beschrieben: Granulome mit zentralem Nekroseherd, Granulome ohne Nekroseherd, Granulome mit vor allem neutrophiler Granulozytenansammlung und eine diffuse granulomatöse Entzündung (DORIA-TORRA et al., 2016). Bei Granulomen mit zentralem Nekroseherd befindet sich zentral der Granulome ein nekrotischer Bereich, der aus zerstörten zellulären Bestandteilen mit wenigen degenerierten neutrophilen Granulozyten besteht. Viele Makrophagen sowie wenige Lymphozyten und Plasmazellen umgeben dieses nekrotische Zentrum. Außen um die Granulome befindet sich fibrotisch verändertes Gewebe (MURRAY et al., 2010; DORIA-TORRA et al., 2016). Beim zweiten Typ, Granulome ohne Nekrose, sind zentral viele Makrophagen mit moderater Ansammlung von diffus verteilten Lymphozyten und einer geringen Anzahl von neutrophilen Granulozyten zu finden. In Granulomen mit neutrophiler Granulozytenansammlung treten vorwiegend neutrophile Granulozyten und wenige Makrophagen im zentralen Bereich auf, wobei wenige Lymphozyten und Plasmazellen in der Peripherie der Granulome angeordnet sind. Die diffuse granulomatöse Entzündung tritt im ZNS auf und ist gekennzeichnet durch eine pyogranulomatöse Leptomeningitis, choroidale Plexitis, Ependymitis und Enzephalomyelitis (MURRAY et al., 2010; DORIA-TORRA et al., 2016). Der Großteil der Zellen besteht aus Makrophagen, die zusammen mit einer moderaten Anzahl von Plasmazellen diffus im entzündeten pyogranulomatösen Gebiet verteilt sind (DORIA-TORRA et al., 2016). Vor allem in Granulomen mit nekrotischem Zentrum ist ein hoher Virusgehalt nachweisbar (KIPAR & MELI, 2014). DORIA-TORRA und Mitarbeiter (2016) merkten zu den verschiedenen Typen von Granulomen an, dass diese Einteilung und die unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung von verschiedenen Stadien der FrSCoV-Erkrankung herrühren können (DORIA-TORRA et al., 2016). So konnten in Untersuchungen bei einem Frettchen sogar verschiedene Granulomtypen in demselben Organ gefunden werden (DORIA-TORRA et al., 2016). Dies könnte die

Folge von verschiedenen Virämieepisoden sein (DORIA-TORRA et al., 2016).

Die Diagnose einer durch FrSCoV-verursachte Erkrankung wird wie bei der FIP mittels immunhistochemischer Färbung von veränderten Organen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers FIPV3-70 sichergestellt (MARTINEZ et al., 2006; MARTINEZ et al., 2008; MURRAY et al., 2010). In einer Studie von GARNER und Mitarbeitern (2008), bei der 23 Frettchen mit FrSCoV-Infektion untersucht wurden, konnte in pyogranulomatösen Läsionen aller Frettchen FrSCoV-Antigen nachgewiesen werden (GARNER et al., 2008). Die Färbung war dabei in Lymphknoten, Milz und in entzündeten Geweben am prominentesten (GARNER et al., 2008).

2.3. Coronavirusinfektionen der Hunde

Bisher wurden bei Hunden 3 verschiedene CoV-Infektionen, nämlich das canine enterale CoV (canine enteric coronavirus, CECoV), das canine pantropische CoV und das canine respiratorische CoV (canine respiratory coronavirus, CRCoV) beschrieben (Tab. 1) (BUONAVOGLIA et al., 2006). Das CECoV führt gelegentlich zu intestinalen Symptomen bei Hunden (LU et al., 2016). Es kann mutieren und dadurch bei Jungtieren zu fatalen Verläufen mit Todesfolge führen (BUONAVOGLIA et al., 2006). Dieses mutierte Virus wird pantropisches canines CoV (pantropic canine CoV, panotropic CCoV) genannt (ZICOLA et al., 2012). Das CRCoV bleibt auf den Atmungsstrakt beschränkt und verursacht meist in Koinfektion mit anderen Erregern respiratorische Symptome (ERLES et al., 2003; PRIESTNALL et al., 2006; SCHULZ et al., 2014; DECARO et al., 2016).

2.3.1. Canines enterales Coronavirus

Das CECoV bleibt auf den Darm beschränkt und führt gelegentlich zu gastrointestinalen Symptomen, wie Anorexie, Erbrechen oder Diarrhoe (TENNANT et al., 1991; DECARO et al., 2012). Auch bei gesunden Hunden kann das CECoV im Kot nachgewiesen werden (TENNANT et al., 1991; DECARO & BUONAVOGLIA, 2011).

2.3.1.1. Ätiologie und Epidemiologie

Phylogenetisch gehört das CECoV der Gruppe 1, den Alphacoronaviren, an (Tab. 1). CECoV wurden erstmals im Jahre 1971 bei deutschen Militärhunden mit Durchfallsymptomen beschrieben (BINN et al., 1974). Bisher wurden zwei Subtypen des CECoV identifiziert, CECoV-Typ-I und -Typ-II, welche beide zu Enteritiden bei Hunden führen können. Sie treten meist in Kombination auf (DECARO et al., 2007; DECARO et al., 2008). Das CECoV-Typ-I ist dem FCoV-Typ-I sehr ähnlich. Genetische Untersuchungen zeigten, dass das FCoV-Typ-II durch eine Rekombination des FCoV-Typ-I mit dem CECoV-Typ-I entstanden ist (Abb. 7) (LE PODER, 2011). Dabei übernahm das CECoV-Typ-I die Sequenz des S-Proteins des FCoV (Abb. 7). Dieses CECoV-Typ-I wurde daher zeitweise als FCoV-ähnliches canines Coronavirus (FIP-like CCoV) bezeichnet (PRATELLI et al., 2003). Das CECoV-Typ-II wurde demgegenüber zu den „klassischen“ CECoV-Stämmen gezählt. Es zeigt einen hohen Verwandtschaftsgrad zu den Vertretern des Serotyps-II des FCoV sowie zum transmissiblen Gastroenteritisvirus (TEGV) der Schweine (LE PODER, 2011). Das FCoV-Typ-II entstand durch Rekombination des FCoV-Typ-I mit dem CECoV-Typ-II. Bei diesen Rekombinationen wurde ein neues S-Protein übernommen (Abb. 7) (LORUSSO et al., 2008). Durch Rekombinationen zwischen dem TEGV und dem CECoV-Typ-II entwickelte sich ein weiteres, neues CECoV-Typ-II, das sogenannte TEGV-ähnliches CECoV (TEGV-like CCoV, CCoV-Typ-IIb), bei dem der N-terminale Bereich des S-Proteins dem des TEGV sehr ähnlich ist, der Rest des Genoms dieses CECoV aber dem üblichen Aufbau des CECoV entspricht (Abb. 7) (DECARO et al., 2009; NTAFIS et al., 2013). Aufgrund von Rekombinationen entweder mit dem TEGV oder mit dem CECoV wurde das CECoV-Typ-II in 2 Subtypen klassifiziert, nämlich das klassische CECoV, CCoV-Typ-IIa und dem rekombinanten, TEGV-ähnlichen CCoV, CCoV-Typ-IIb (DECARO et al., 2009; DECARO et al., 2013).

Das CECoV ist in der Hundepopulation weit verbreitet (PRIESTNALL et al., 2006). Bei gesunden Hunden sowie bei Hunden mit Durchfallsymptomen konnten TENNANT und Mitarbeiter (1991) bei 54 % Antikörper gegen das CECoV nachweisen (TENNANT et al., 1991). Die Antikörperprävalenz steigt, wenn mehrere Hunde auf engem Raum gehalten werden. So haben 76 % der Hunde in Tierheimen Antikörper gegen das CECoV. In Zuchtcolonien können bei bis zu

100 % der Hunde Antikörper nachgewiesen werden (TENNANT et al., 1993).

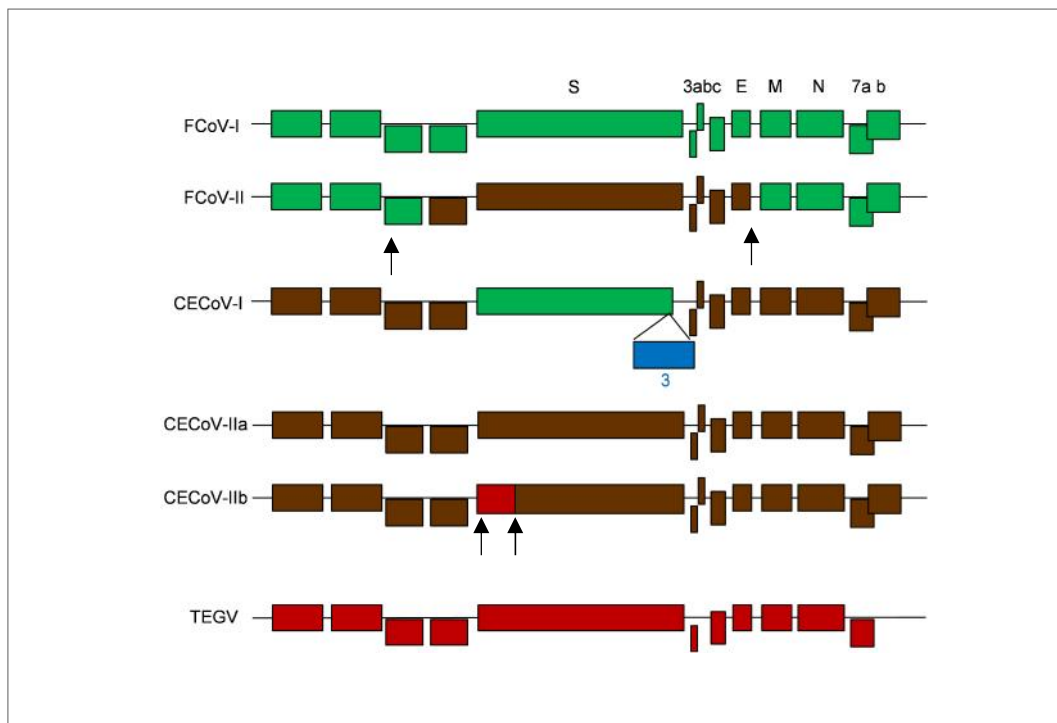


Abbildung 7: Genomischer Aufbau von caninen Coronaviren und feline Coronaviren.

In Anlehnung an LE PODER, 2011. Mit freundlicher Genehmigung von Le Poder (Creative Common Attribution License erlaubt uneingeschränkte Verwendung).

FCoV: felines Coronavirus Serotyp I und II; CECoV: canines enterales Coronavirus Serotyp I, Ila und I Ib; grün: Sequenz des feline Coronavirus; braun: Sequenz des caninen Coronavirus; blau: offene Leseraster 3 (ORF 3); rot: Sequenz des transmissiblen Gastroenteritisvirus der Schweine (TEGV); S: Spikeprotein; 3abc: offene Leseraster (ORF) 3a, 3b und 3c; E: Hüllprotein (Envelope-Protein); M: Membranprotein; N: Nukleokapsid; 7ab: nicht-Strukturproteine 7a und 7b; Pfeile: Bereiche, bei denen häufig Rekombinationen statt finden.

2.3.1.2. Pathogenese

Das CECoV ist weltweit verbreitet und stellt vor allem in Tierheimen und Zwingern, in denen viele Hunde auf engem Raum gehalten werden, ein Problem dar (DECARO & BUONAVOGLIA, 2008, 2011). In den meisten Fällen führt eine CECoV-Infektion zu milden Gastroenteritiden mit Durchfallsymptomen (CARMICHAEL & BINN, 1981; TENNANT et al., 1991; BUONAVOGLIA et al., 2006). Die Infektion erfolgt oral durch Aufnahme von infiziertem Kot oder Kontakt

zu infizierten Tieren und Gegenständen (TENNANT et al., 1991; DECARO et al., 2012; NTAFIS et al., 2013). Nach einer Inkubationszeit von 1–4 Tagen werden zuerst die Tonsillen befallen. Daraufhin kommt es zu einer Infektion der Darmepithelzellen vor allem des ersten Dünndarmabschnittes (EVERMANN et al., 2005; DECARO & BUONAVOGLIA, 2011). Zerstörung der Darmepithelzellen und der Darmzotten führt zu einer meist milden Diarrhoe und zu Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten (BINN et al., 1974). Nur selten führen derartige Durchfälle zum Tod (TENNANT et al., 1991; DECARO & BUONAVOGLIA, 2008).

2.3.1.3. Pathologische Veränderungen

In der pathologischen Untersuchung bei Hunden mit einer symptomatischen CECoV-Infektion konnte eine milde bis moderate Enteritis gesehen werden, die meist auf den Dünndarm beschränkt war. Der Darm enthielt wenig mukoiden, gelblich-bräunlichen Kot (TENNANT et al., 1991; ZICOLA et al., 2012). Histologisch dominierten eine Villiatriphie sowie eine Villifusion. Darmkrypten waren teilweise dilatiert und enthielten degenerierte, nekrotische Zellen (DECARO & BUONAVOGLIA, 2011; ZICOLA et al., 2012). In manchen Fällen waren Durchfallssymptomatiken beschrieben, ohne dass histologische Veränderungen des Darmes vorhanden waren (TENNANT et al., 1991).

Das CECoV kann über eine immunhistochemische Färbung des Darmes mit einem Alphacoronavirus-1-monoklonalem Antikörper dargestellt werden. Diese Methode wird zur Identifikation der Ursache bei Durchfällen mit schwerwiegenden Verläufen mit Todesfällen eingesetzt (ZICOLA et al., 2012).

2.3.2. Canines pantropisches Coronavirus

Durch in-vivo-Mutation kann das CECoV seinen Organotropismus ändern und eine systemische Erkrankung mit Todesfällen verursachen (BUONAVOGLIA et al., 2006; DECARO et al., 2012; ZICOLA et al., 2012). Erstmals wurde eine derartige systemische Erkrankung bei Hundewelpen im Jahre 2005 beschrieben (BUONAVOGLIA et al., 2006).

2.3.2.1. Ätiologie und Epidemiologie

Das pantropische canine Coronavirus gehört ebenfalls der Gruppe 1 der CoV, den Alphacoronaviren an (Tab 1). Durch Mutation kann aus dem CECoV diese hochvirulente Variante, das pantropische CCoV (Stamm CB/05), entstehen, die zu Todesfällen bei Jungtieren führen kann (BUONAVOGLIA et al., 2006). Diese virulente Variante entsteht höchstwahrscheinlich aus dem TEGV-ähnlichen CECoV, CECoV-Typ-IIa (Abb. 7) (LE PODER, 2011). DECARO und Mitarbeiter (2012) untersuchten das Genom des pantropischen CCoV näher. Der Stamm des pantropischen CCoV CB/05 beinhaltet eine Mutation im Bereich des S-Gens und eine Deletion im ORF 3b (DECARO et al., 2012). Ein anderer Stamm des pantropischen CCoV 450/07 enthielt zudem eine Deletion im ORF 3c (DECARO et al., 2012). Nicht alle virulenten pantropischen CCoV haben Veränderungen im Bereich ORF 3abc, Mutationen des S-Gens scheinen aber, wie bei FIP, eine große Bedeutung in der Pathogenität zu haben (DECARO et al., 2012; DECARO et al., 2013).

Die Prävalenz der durch pantropische CCoV verursachten Erkrankung ist unbekannt. Seit Mai 2005 werden aber immer wieder fatale Krankheitsausbrüche bei Welpen beschrieben (BUONAVOGLIA et al., 2006; DECARO et al., 2008; DECARO & BUONAVOGLIA, 2011; DECARO et al., 2012; ZICOLA et al., 2012).

2.3.2.2. Pathogenese

Folge der Mutation ist die Änderung des Zelltropismus. Das mutierte CECoV wird von Makrophagen aufgenommen und im gesamten Körper verteilt (BUONAVOGLIA et al., 2006; DECARO et al., 2012). Die damit verbundene systemische Infektion führt vor allem bei Welpen zu fatalen Verläufen (DECARO & BUONAVOGLIA, 2011; DECARO et al., 2012; ZICOLA et al., 2012). Vor allem Jungtiere im Alter von 6–12 Wochen können schwerwiegende Symptome mit akuter Lymphopenie und Todesfällen entwickeln (CARMICHAEL & BINN, 1981; TENNANT et al., 1991; BUONAVOGLIA et al., 2006). Das pantropische CCoV führt zu hämorrhagischen und nekrotischen Läsionen in Gastrointestinaltrakt, Tonsillen, Lunge, Leber, Milz, Nieren und Gehirn (TENNANT et al., 1991; EVERMANN et al., 2005; DECARO & BUONAVOGLIA, 2011; DECARO et al.,

2012; ZICOLA et al., 2012). Die Welpen sterben meist an dem massiven Flüssigkeits- und Eiweißverlustes oder aufgrund ausgeprägter Bronchopneumonien (TENNANT et al., 1991; EVERMANN et al., 2005; DECARO & BUONAVOGLIA, 2011; DECARO et al., 2012; ZICOLA et al., 2012). Das Virus vermehrt sich im Lymphgewebe und führt bei vielen infizierten Welpen zur Lymphopenie (DECARO & BUONAVOGLIA, 2011). Im Blut konnte die RNA bisher nicht nachgewiesen werden (DECARO & BUONAVOGLIA, 2011). Die Mortalitätsrate ist sehr hoch. Allerdings wurden bei den Krankheitsausbrüchen vereinzelt Fälle beschrieben, die nicht tödlich endeten. So überlebte bei dem Ausbruch im Jahre 2005 nur ein Welpe von insgesamt 7, die an dem pantropischen CoV erkrankt waren (BUONAVOGLIA et al., 2006). In den Ausbrüchen von 2008 und 2009 überlebte ebenfalls nur ein Welpe von insgesamt 21 erkrankten Hunden. Die meisten Hunde starben innerhalb der ersten Tage (ZICOLA et al., 2012). Auch experimentelle Infektionen verlaufen nicht immer tödlich. Experimentelle Infektionen führten zu einer Schwächung des Immunsystems aufgrund der Depletion von Lymphozyten während der Erkrankung. Diese war bis zu 2 Monaten nach Remission nachweisbar. Daher sind sie während dieser Phase anfälliger für andere Infektionen (DECARO & BUONAVOGLIA, 2011).

2.3.2.3. Pathologische Veränderungen

In der pathologischen Untersuchung konnten bei Welpen mit einer pantropischen CCoV-Infektion Veränderungen im Bereich des Darmes und weiterer Organe, wie Tonsillen, Lunge, Leber, Milz und Nieren, gesehen werden (DECARO & BUONAVOGLIA, 2011; ZICOLA et al., 2012). In einer Untersuchung von DECARO und BUONAVOGLIA (2011) fiel makroskopisch primär eine ausgeprägte hämorrhagische Gastroenteritis ins Auge. Durch Ulzerationen am Magen war Meläna zu sehen. Die Tonsillen waren meist vergrößert und enthielten multifokale Einblutungen. Weiterhin konnte eine Bronchopneumonie nachgewiesen werden, die vor allem im cranialen und caudalen Lobus sichtbar war. Bei manchen Welpen konnten Thoraxergüsse gefunden werden. Viele Welpen zeigten eine Degeneration des Lebergewebes. Auffällig war dabei die gelblich-bräunliche Verfärbung der Leber (DECARO & BUONAVOGLIA, 2011).

In der histologischen Untersuchung des Dünndarmes waren eine Atrophie und

Fusion der Mikrovilli des Darmes mit degenerierten und nekrotischen Darmkrypten und teilweise einer Ansammlung neutrophiler Granulozyten zu sehen (EVERMANN et al., 2005; ZICOLA et al., 2012). Eine subakute Enteritis war histologisch durch eine Makrophageninfiltration der Lamina propria gekennzeichnet (ZICOLA et al., 2012). Lymphatisches Gewebe war ödematös verändert. Bei einigen Tieren lag eine Depletion der Lymphfollikel vor (ZICOLA et al., 2012). In der Lunge konnten konfluierende, bronchoalveoläre Läsionen mit fibrinopurulentem Exsudat oder multifokale Petechien zu sehen sein (EVERMANN et al., 2005; ZICOLA et al., 2012). Meistens lag eine diffuse Leberdegeneration mit Nekroseherden und Milzdegeneration mit Arteriennekrosen vor. Zudem fand eine Infiltration von Makrophagen in das hämorrhagische und hyperämische Parenchym betroffener Organe statt (BUONAVOGLIA et al., 2006; DECARO & BUONAVOGLIA, 2011). In den Nieren konnten peripher hyperämische Bereiche mit Nekrosen im Bereich der Nierenkapsel sowie eine Degeneration der Gefäßwände der Arterien dargestellt werden (DECARO & BUONAVOGLIA, 2011).

Das pantropische CoV kann über eine immunhistochemische Färbung der betroffenen Organe verifiziert werden. Hierfür wird das Antigen in Makrophagen mit dem Alphacoronavirus-1-monoklonalem-Antikörper dargestellt (DECARO & BUONAVOGLIA, 2008, 2011; ZICOLA et al., 2012).

2.3.3. Canines respiratorisches Coronavirus

Das CRCoV zählt zur Gruppe 2 der CoV, den Betacoronaviren (Tab. 1). Dieses Virus kann zu Atemwegssymptomen führen. Es wird mit vielen weiteren Viren oder Bakterien der caninen infektiösen Tracheobronchitis (CRID, canine respiratory infectious disease) zugeordnet (ERLES et al., 2004; BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007).

2.3.3.1. Ätiologie und Epidemiologie

Im Jahre 2003 wurde das CRCoV zum ersten Mal bei Hunden mit CRID beschrieben (DECARO et al., 2007). Das Virus konnte vor allem bei Hunden aus Tierheimen und Hundeschulen mit respiratorischen Symptomen isoliert werden (ERLES et al., 2003). Zusammen mit dem Bakterium *Bordetella bronchiseptica*,

dem caninen Adenovirus-Typ-1 und -Typ-2, dem caninen Parainfluenzavirus, dem caninen Herpesvirus sowie Reoviren kann das CRCoV für die Entstehung die CRID verantwortlich sein (ERLES et al., 2004). Das CRCoV ist dem bovinen CoV, das ebenfalls der Gruppe 2 der CoV angehört und zu respiratorischen Symptomen bei Kühen führt, mit einer Sequenzübereinstimmung des S-Gens von 94 % und des Gens der Polymerase von 99 % sehr ähnlich (ERLES et al., 2003). Zum S-Protein des CECoV besteht eine Sequenzübereinstimmung von nur 21 % (ERLES et al., 2003). Daher geht man davon aus, dass das CRCoV ursprünglich durch Übertragung des bovinen CoV auf Hunde entstanden ist (PRIESTNALL et al., 2006). ERLES und Mitarbeiter (2003) konnten in Untersuchungen von Hunden mit respiratorischen Symptomen, die neu in ein Tierheim gebracht wurden, bei 30 % Antikörper gegen das CRCoV nachweisen (ERLES et al., 2003). Nach einem dreiwöchigen Aufenthalt in diesem Tierheim stieg die Antikörperprävalenz auf 99 %, was die hohe Kontagiösität des CRCoV verdeutlicht (ERLES et al., 2003). Die RNA des CRCoV konnte mittels RT-PCR in verschiedenen Studien bei Hunden mit respiratorischen Symptomen im unteren Atmungstrakt bei 1–27 % der Hunde nachgewiesen werden (ERLES et al., 2003; ELLIS et al., 2005; KANESHIMA et al., 2006; PRIESTNALL et al., 2006; YACHI & MOCHIZUKI, 2006; DECARO et al., 2007; AN et al., 2010; SCHULZ et al., 2014).

2.3.3.2. Pathogenese

Das CRCoV bleibt auf den Atmungstrakt beschränkt. Die Übertragung erfolgt durch eine orale Aufnahme des Virus über respiratorische Sekrete von infizierten Hunden (ERLES & BROWNLIE, 2008). Die Replikation des CRCoV findet im Epithel des Atmungstraktes statt und führt dort zur Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). Es ist unbekannt, ob das CRCoV alleine zu Atemwegssymptomen führen kann (PRIESTNALL et al., 2006; DECARO et al., 2016) oder ob Koinfektionen mit anderen Erregern nötig sind. Bisher konnte CRCoV-RNA nicht in den Atemwegen von gesunden Hunden nachgewiesen werden. Dies spricht für eine primäre pathogene Bedeutung. Durch die Replikation dieses Virus im Atmungstrakt wird das mukoziliäre System beeinträchtigt (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007; SCHULZ et al., 2014). Da Bakterien und Viren bei reduzierter mukoziliärer Clearance leichter in den

Atmungstrakt gelangen können, steigt das Risiko von Sekundärinfektionen (ERLES & BROWNLIE, 2008). Entstehen Sekundärinfektionen oder treten Koinfektionen mit dem caninen Adenovirus-Typ-1 oder -Typ-2, dem caninen Parainfluenzavirus oder *Bordetella bronchiseptica* auf, sind Symptome möglich (PRIESTNALL et al., 2006; DECARO et al., 2016). Nur in seltenen Fällen und bei Komplikationen, wie einer Bronchopneumonie, kann eine CRCoV-Infektion zum Tode führen (ERLES et al., 2004; DECARO et al., 2016).

2.3.3.3. Pathologische Veränderungen

In einer Studie wurden 36 Hunde nach experimenteller Infektion mit dem CRCoV pathologisch und histologisch untersucht (MITCHELL et al., 2013). Makroskopisch konnte bei diesen Patienten ein Entzündungsprozess in den Atemwegen, wie eine katarrhalische Rhinitis, Pharyngitis, Laryngitis sowie Tracheitis und Bronchitis vorhanden sein (MITCHELL et al., 2013).

Histologische Veränderungen waren in Nasenlöcher und der Trachea zu sehen. Die ziliäre Funktion war dabei eingeschränkt (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). Mikroskopisch waren hyperplastische Follikel der Tonsillen und Kehlganglymphknoten mit Retikulumszellenproliferation zu sehen. In der entzündeten Lunge konnten Lymphozytenaggregate dargestellt werden, die im Bereich der Atemwege und der Blutgefäße zu finden waren. Das Lymphgewebe war in schwerwiegenderen Fällen hyperplastisch (MITCHELL et al., 2013).

Durch die immunhistochemische Färbung des veränderten Gewebes mit dem polyklonalen Anti-bovinen-CoV-Antikörper kann das CRCoV-Antigen dargestellt werden (MITCHELL et al., 2013). Meist konnte das Virus in der Trachea, in den Tonsillen und in der Lunge nachgewiesen werden (MITCHELL et al., 2009).

III. EIGENE STUDIE I

Das Ziel dieser Studie war es, die Untersuchungsmethode der IZC an Zellproben, die das FCoV enthalten, zu evaluieren. Hierzu wurden vorerst Zellproben von leicht zugänglichen Geweben mit zellulärem Antigen verwendet, an denen die Auswirkung verschiedener Vorbehandlungen auf die Antigenität und die Darstellung dieser Antigene über die IZC untersucht wurde. Die Vorbehandlungen beinhalteten die Färbung der Zellproben mit einer gängigen Färbemethode, das Eindeckeln mit einem Einbettmedium und die Mikrowellenbehandlung. Diese Vorbehandlungen wurden einzeln und in Kombination durchgeführt. Die Methoden mit den besten Ergebnissen zur Darstellung des zellulären Antigens der Zellproben wurden letztendlich bei Körperhöhlenergussproben, die das virale Antigen enthielten, angewendet.

Antigens under cover – preservation and demasking of selected antigens for successful post-staining immunocytochemistry of CSF samples, brain smears and lymph node aspirates

Stefanie Gründl¹

Lara A. Matiassek¹, Dr. med. vet., Dipl. ECVN

Sandra Felten¹

Laura Sangl¹

Katrin Hartmann¹, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

Kaspar Matiassek², Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Associate Member ECVN

¹ Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Munich, Germany

² Section of Clinical & Comparative Neuropathology, Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Munich, Germany

Journal of Veterinary Clinical Pathology, zur Veröffentlichung angenommen

Die Genehmigung aller Koautoren zum Abdruck des Manuskripts in der Dissertationsschrift liegt vor.

1 *Technical Report*

Running Title: Post-staining-ICC

2

3 Antigen under cover – preservation and demasking of selected
4 antigen for successful post-staining immunocytochemistry of
5 CSF samples, brain smears and lymph node aspirates

6

7 Stefanie Gründl¹, Lara A Matlasek¹, Sandra Felten¹, Laura Sangl¹, Katrin Hartmann¹,
8 Kaspar Matlasek²

9

10 ¹Clinic of Small Animal Medicine and ²Section of Clinical & Comparative Neuropathology, Centre for
11 Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany.

12

13

14

15

16

17

18 **Corresponding Author**

Prof. Dr. K. Matlasek

19

Section of Clinical & Comparative Neuropathology

20

Centre for Clinical Veterinary Medicine

21

Ludwig-Maximilians-Universität

22

Veterinarstr. 13, D-80539 Munich, Germany

23

Email: kaspar.matlasek@neuropathologie.de

24

Tel.: +49-89-2180 3313

25

26

27

28 **Abstract**

29 **Background:** In clinical cytology, the applicability of ancillary diagnostic procedures
30 such as immunocytochemistry all too often is limited by low sample volumes, poor
31 representativity and poor preservation of cells. Therefore, the diagnostician has to
32 choose standard cytology, although specific techniques such as immunocytochemistry
33 are in many cases essential to find the definitive diagnosis.

34 **Objectives:** The goal of the present study was to investigate the applicability of
35 immunocytochemistry to prestained cytological specimens. Different pretreatments were
36 examined to determine which one preserved the antigenicity best.

37 **Methods:** In total, 122 touch cytologies and 64 fine-needle-aspiration specimens taken
38 from the brain and lymph nodes of a cat and a pig were processed and evaluated
39 microscopically. The impact of cytological staining with modified Wright's stain,
40 destaining, coverslipping and decoverslipping cycles and microwave treatment were
41 examined in the immunolabelling of nuclear, cytoplasmic and plasmalemmal antigens as
42 well as intracellular feline coronavirus (FCoV). Biotinylated secondary antibodies were
43 used, and bound primary antibody was visualized by an ABC amplification kit.

44 **Results:** Cellular antigens were reliably detected via immunocytochemistry after
45 cytological prestaining if the smears were coverslipped early after staining and stayed
46 coverslipped until immediately before immunolabelling. The staining intensity reached
47 the same levels as that of the controls if the cytofilm underwent microwave treatment in
48 citrate buffer. In contrast, FCoV antigen detection was abolished after any type of
49 physicochemical interference.

50 **Conclusion:** Post-staining immunocytochemistry represents a practicable tool for
51 second-set investigations of preevaluated cytological specimens if searching for cellular
52 antigens. Paired untreated samples should be kept in case the work-up requires testing
53 for more vulnerable viral antigens.

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64 **Keywords**

65 Coverslipping, neurocytology, destaining, feline infectious peritonitis, FIP, microwave

66 Introduction

67 Investigation of cytological specimens obtained by fine-needle aspiration (FNA) is the
68 least invasive approach to obtain a diagnosis of altered tissues.^{1,2,3} Cytomorphology,
69 however, can only provide limited insights, such as the biology of a neoplastic disorder or
70 the etiology of an infective process, if not accomplished by more specific disease
71 markers.² In contrast to histological investigations, which allow for multiple sections of
72 even one single cell, repetitive imprints and FNA of the same site by no means can
73 reproduce exactly the same composition of cells and tissue components.² In addition to
74 these technological preclusions, the type and distribution of a lesion can pose essential
75 limitations to its holistic cytological characterization. Thus, detectability is compromised if
76 the disorder is poorly exfoliative and paucicellular, affects remotely sheltered tissues (e.g.,
77 central nervous system (CNS)) and sparse fluids (e.g., cerebrospinal fluid (CSF)),
78 presents with low density or sparse distribution of atypical cells and pathogens, and
79 renders the involved cells highly vulnerable to shearing stress.

80 For elucidation of changes in samples with a low yield of cells, ideally, a set of multiple
81 investigations should be carried out on the same slide rather than single investigations on
82 multiple specimens with variable representativity.

83 The simplest types of secondary procedures use conventional stains to highlight
84 microorganisms, chemical compounds, matrix components, and subcellular structures
85 histochemically after removal of the previous dye. With advancement of panoptic stains,
86 indications for special stains have mainly focused on microbial and fungal organisms (e.g.,
87 Ziehl-Neelsen, Fite-Faraco, Gram, Fontana-Masson), assessment of mucins and

88 polysaccharides (e.g., Alcian blue, Periodic acid-Schiff), iron pigments, and melanin (e.g.,
89 Prussian blue reaction, Nile blue A, Fontana-Masson).² As the cellular context in these
90 situations is rarely necessary, additional staining often can be successfully conducted on
91 spare slides.² Other infectious disease and tumor cell antigens, however, may require
92 preselection and cytomorphological characterization of the cell to be stained.^{2,3} This holds
93 true in particular for advanced tumor diagnosis.^{3,4} Immunocytochemistry (ICC) on
94 prestained slides (post-staining ICC, PSICC) could help to identify the histogenetic origin
95 of a tumor and cell type, to characterize individual cells that do not provide distinctive clues
96 on conventional stains and to obtain further prognostic and predictive information.^{3,5,6,7,8}
97 In infectious diseases, PSICC may be a promising tool for intracellular detection of viral
98 proteins. One of the most common situations in which the presence of a viral antigen
99 requires the cellular context is the intramacrophageal demonstration of feline coronavirus
100 (FCoV) for the diagnosis of feline infectious peritonitis (FIP).^{9,10} This approach again
101 requires preservation of both the target antigen and the morphology of the host cells.

102 In the past, PSICC methodology has been tailored to individual case scenarios. Therefore,
103 systematic studies on the reproducibility, efficacy and reliability of the immunostaining are
104 rare (Supporting Table 1). Hence, the present study aimed to fill this gap by establishing
105 reproducible guidelines for PSICC labelling of cellular and viral antigens in tissue imprints,
106 FNA, and cytospun fluids. Therefore, the focus was particularly on antigen preservation
107 and retrieval. Selection of target antigens was driven by our high caseload of
108 neurocytological specimens from dogs and cats with possible inflammatory and infectious
109 CNS diseases.

110

111 **Materials and Methods**112 **Study design**

113 This study investigated (1) the applicability of ICC to prestained cytological specimens,
114 (2) whether coverslipping is an option for preserving antigenicity and (3) whether
115 microwave treatment enhances immunodetection in prestained smears. Therefore, ICC
116 staining quality was evaluated in slides after prestaining with modified Wright's stain
117 (modWS) and destaining with hydrochloric acid and was compared to unstained
118 samples with and without coverslipping and microwave treatment. The effects were
119 evaluated for a set of cellular antigens with a distinct subcellular distribution (study A)
120 and for intracellular FCoV protein (study B).

121

122 **Study A - cellular antigens**

123 Individual pretreatments were tested with regard to their impact on the immunostaining
124 of nuclear, cytoplasmic and membrane antigens. The systematic evaluation therefore
125 employed distinct methodological trials, as illustrated in Figure 1 and Table 2.

126 A series of 122 touch cytologies and 64 fine needle-aspiration (FNA) specimens were
127 taken from the brain and lymph nodes of a cat and a pig subjected to postmortem
128 examination (< ¼ hour after euthanasia) for diagnostic reasons unrelated to the purpose
129 of this study. CNS cells were obtained from the post-cruciate gyrus of the brain after

130 extensive craniectomy, encephalectomy and trimming, as described elsewhere.^{11,12}
131 Lymphocyte-enriched samples were collected from superficial cervical and para-aortic
132 lymph nodes via FNA using a 22-gauge syringe. All slides were air dried immediately.

133 A set (30/186) of cytology smears (20 CNS; 10 FNAs) was stained for cytomorphological
134 examination (trial 1) using a Hematek® Slide Stainer (Siemens Healthcare Diagnostic,
135 Inc., Tarrytown, NY 105-5097 USA). Another 24 slides (8 per antigen) were stained with
136 modified Wright's stain (modWS) and coverslipped using xylene-based mounting
137 medium (Histokitt®, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Rhön,
138 Germany), and underwent "hot mount" polymerization through microwave treatment
139 (MWT: 2 minutes, 600 watts, dry) prior to PSICC (Table 2). All these slides were
140 coverslipped for at least 5 days. The pure effect of the staining-destaining cycle (SDS,
141 24 slides) on immunodetection (trial 3) plus the additive effects by additional
142 coverslipping-decoverslipping (SDS-CDC, 36 slides) (trial 4), were investigated in
143 another 60 slides. These were compared to 36 pure CDC slides (trial 5) and to a series
144 of 24 slides left plain from the scratch to serve as the gold standard (trial 6) (Table 2). All
145 samples were stored for up to three months.

146 All but the slides from trial 6 underwent the abovementioned laboratory treatments
147 preceding ICC. Cover-slipped samples of trials 2, 4 and 5 were immersed in xylene for
148 liquefaction of the mounting medium until the coverslides slipped off. Thereafter, the slides
149 underwent a descending ethanol series (2 x 100%, 1 x 96%, 1 x 70%; 5 minutes each)
150 and immersion in distilled water.

151 Pre-stained decoverslipped slides (trials 2 & 4) and those left uncovered after modWS
152 (Tier 3) were immersed in 1% hydrochloric acid (HCl) under microscopic control until the
153 color had faded completely. Freshly destained slides (trials 2, 3 & 4) and non-stained
154 decoverslipped samples of trial 5 were immersed in distilled water until ICC (Figure 1,
155 Table 2).

156 Prior to immunocytochemistry, one set of slides of each tier (Tier 2, 3, 6: each n = 12; Tier
157 4, 5: each n = 18; Figure 1 and Table 2) was subjected to microwave treatment (MWT)-
158 based antigen retrieval. Therefore, the slides were transferred to a cuvette containing 0.01
159 mol citrate buffer (pH 6). Based on our immunohistochemical protocol, MWT was carried
160 out for 5 minutes/800 watts followed by 20 minutes/250 watts. The slides were left in
161 citrate buffer for 30 minutes to cool down to room temperature. All further steps except
162 incubation with the primary antibodies (pABs) were carried out at room temperature.

163 MW-treated slides and those kept in distilled water (de-stained and unstained slides
164 without MWT, Table 2) were bathed in 0.01 mol phosphate-buffered saline (PBS; pH
165 7.2) for 20 minutes. Endogenous peroxidase was quenched for 35 minutes by adding
166 hydrogen peroxide (H_2O_2) to the PBS. Thereafter, the slides were washed in fresh PBS,
167 transferred to a humid chamber and incubated with normal goat serum (1:20; MP
168 Biomedicals, LLC 3 Hutton Center Drive, Suite 100, Santa Ana, CA 92707, USA) for 30
169 minutes.

170 Upon removal of the non-immune serum, lymph node FNAs were incubated with anti-
171 CD3 antibody for detection of the corresponding T cell antigen. Other markers

172 addressing NeuN and GFAP were used on separate brain smears (Table 3). Each run
173 contained site-matched slides in which a pAB was replaced by antibody diluent serving
174 as a negative control (altogether n = 12). The incubation was carried out for 18 hours at
175 4°C (39.2°F).

176 After repeated washing steps in PBS, the slides were mounted with biotinylated goat
177 anti-rabbit/mouse IgG antibodies (both DAKO®, Glostrup, Denmark) for 1 hour. Bound
178 pAB was subsequently visualized by an ABC amplification kit (Vectastain®, Vector
179 Laboratory Inc., Burlingame, USA) using diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) as
180 the chromagen. The enzyme reaction was blocked by PBS rinses. The slides then were
181 counterstained with Mayer's hemalum (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany),
182 underwent an ascending ethanol series and were cover-slipped as described above.

183 Cell yield and preservation were assessed through bright field microscopy by two different
184 raters. In separate sessions, these raters evaluated the ICC outcome blinded to the origin
185 of the smears, type of pretreatment and kind of pAB. Determinants of ICC quality were (1)
186 cell type specificity and (2) intensity of cellular staining, (3) presence/absence of acellular
187 background activity and (4) unspecific staining. These parameters were semiquantitatively
188 scored by using a 4-point system (0 to 3). In the event of intraobserver disagreement, the
189 slides were reviewed on a multiheaded microscope (Zeiss AxioPhot, made in western
190 Germany), and mean values were newly assigned.

191 For statistical evaluation, final scores were compared in between the different procedures
192 using non-parametric statistical algorithms. A P -value $\leq .05$ was accepted as indicating
193 statistical significance.

194

195 **Study B – viral antigens**

196 This study evaluated the impact of pretreatments on the immunolabelling of FCoV
197 antigens.

198 Study B was conducted on pleural ($n = 6$) and abdominal ($n = 16$) effusions of feline
199 infectious peritonitis (FIP) cases confirmed via histopathology and positive
200 immunohistochemistry for FCoV antigen.⁹ These effusions were collected using
201 conventional thoracocentesis or abdominocentesis.

202 Harvested fluids were mounted onto uncoated standard slides (Langenbrinck,
203 Emmendingen, Germany) using a cytocentrifuge (Hettich Zentrifugen, Universal 16R).
204 According to our in-house protocol for CSF, centrifugation chambers were spun for 5
205 minutes at 250 g -force, after which the supernatant was removed and the coated slides
206 were centrifuged for 1 minute at 416 g . The slides then were air dried and stored at -
207 20°C (-4°F) until further processing.

208 To evaluate the preservation and antigenicity of the viral antigen, the samples
209 underwent trials 3, 4, 5 and 6 (with and without MWT) as described in study A. ICC was
210 performed using a mouse monoclonal antibody directed against the coronavirus

nucleocapsid (clone FIPV3-70; Table 3). Incubation and subsequent steps were identical to those applied for NeuN labelling (see above) using ABC enhancer and DAB.

The ICC signal was evaluated again by both raters with regard to cellular and subcellular localization, intensity, specificity and background as described above.

Results

Study A – cell specific antigens

For evaluation of the cell preservation, the slides were microscopically assessed.

ModWS-stained slides revealed a representative cell yield, with fewer than 5% of cells suffering crush artifact and fewer than 10% ghost nuclei. Cell preservation was inversely related to cell size, with lymphocytes, glial cells and small granule neurons being less vulnerable to shearing forces compared to large neurons.

All samples were coverslipped for at least 5 days. The time needed for removal of the coverslip upon immersion in xylene corresponded to the duration since coverslipping. In slides coverslipped for fewer than 14 days, the coverslip was removed within 48 hours after incubation. Those coverslipped more than 3 weeks prior required 5 working days until the coverslip came off without manipulation.

The effect of destaining through HCl was assessed under microscopic control. Thin smears from FNA required 10 minutes until complete decoloration. Thick brain smears required HCl treatment for 15 to 20 minutes until complete bleaching.

232 Independent of the blood content, endogenous peroxidase activity was removed
233 completely, when quenching the slides in 0.7% H_2O_2 for 35 minutes, as seen in controls
234 subjected to direct DAB treatment.

235 In unstained and non-coverslipped specimens (trial 6, $n = 24$), ICC for all markers
236 provided good, reliable and reproducible results in terms of high intensity (median
237 intensity score (IS) 2.0 ± 0 to 3.0 ± 0), cell specificity (median cell specificity score (CSS)
238 3.0 ± 0) and absent (CD3, NeuN) to low (GFAP: score 1.5 ± 0.58) background (Figure
239 2A; Table 4). In GFAP only, a background of brownish, cloudy, sometimes flocculent
240 low-intensity staining was evident in all specimens (4/4) (Table 4). The background,
241 though, did not interfere with the distinctive staining of astrocyte somata. Regarding the
242 subcellular distribution of ICC on these plain slides, the CD3 signal was strongest in the
243 periphery of the lymphocyte cytoplasm close to the membrane. NeuN immunoreactivity
244 was restricted to neuronal nuclei, while GFAP diffusely stained the soma and
245 fragmented processes of astrocytes.

246 Even after coverslipping and decoverslipping (CDC only, trial 5), ICC allowed the
247 identification of all three cell types (Figure 2B). However, both the staining intensity and
248 cell specificity of the CD3 and NeuN specimens decreased significantly compared to trial
249 6 ($P \leq .04$), while the GFAP background staining was more severe ($P = .02$) (Table 4
250 and Table 5).

251 The SDS per se (trial 3) did not interfere with immunolabelling if ICC was performed
252 within a couple of days after cytochemical staining. A delay of one to two weeks abolished the
253 immunolabelling significantly (Figure 2C). Hence, the detectability of all markers was

254 severely compromised (cell specificity: $P = .013$; intensity: $P \leq .019$) (Table 4 and Table
255 6). A weak cellular staining was seen in isolated lymphocytes and astrocytes only, while
256 the majority of cells throughout all specimens remained immunonegative.

257 Early coverslipping of modWS-stained specimens (trial 2 & 4) rescued the antigenicity of
258 all three antigens compared to cyto-stained, non-coverslipped slides of trial 3 (intensity
259 and cell specificity: $P < .001$) (Figure 2D; Table 6 and Table 7). A specific signal was
260 obtainable in these slides, with a median IS of 1.0 – 1.5 (Table 7). Non-specific
261 background staining was restricted mostly to GFAP slides (10/10) but remained distinct
262 from cellular chromogen enrichment, as seen in Figure 2D (Table 7). Notably, SDS/CDC
263 had an effect on the subcellular distribution of immunostaining: the CD3 signal extended
264 over the lymphocyte cytoplasm rather than being accentuated in the periphery, while
265 GFAP staining in astrocytes leaked into the nucleus. NeuN staining was still mainly
266 confined to neuronal nuclei; however, the signal was patchy and did not enroll the entire
267 nuclear area (Figure 2D).

268 "Hot mount" coverslipping did not have an impact on the ICC results ($P = \geq .47$), while
269 MWT in citrate buffer significantly increased the staining intensity and cell specificity of
270 all markers ($P \leq .03$, Figure 2E) (Table 7). Therefore, the negative impact of SDS was
271 antagonized for all markers, and the GFAP immunostaining in tier 4 became even
272 stronger than that on the plain slides (CD3: IS $P = .06$; CSS $P = .4$; NeuN: IS $P = .5$;
273 CSS $P = 1.0$; GFAP IS $P = .007$; CSS $P = 1.0$).

274 The positive effect of MWT was restricted to coverslipped slides. Omission of
275 coverslipping in trial 3 failed to rescue antigenicity.

276

277 Study B – FCoV antigen

278 All types of chemical pretreatment (trial 3, 4 & 5) abolished immunostaining of the FCoV
279 nucleocapsid completely (Figure 3A and 3B; Table 8). Therefore, in contrast to the
280 immunodetection of cellular antigens, coverslipping did not protect viral antigenicity in the
281 stained slides (Table 8). Likewise, MWT precluded immunostaining in plain slides of trial
282 6 and, hence, failed to rescue antigen labelling of the pretreated slides.

283

284 Discussion

285 Cytological examination is a valuable tool for establishing a definite tissue diagnosis in
286 practice, according to the ROSE (rapid on-site evaluation) concept and can complement
287 histological studies by showing previously unrecognized features.^{1,12} There is, however,
288 an enormous demand for more specific diagnoses in clinical oncology and infectiology.
289 Special stains are essential, in particular, to confirm or specify a cytological diagnosis
290 such as in atypical and rare infections and undifferentiated neoplasia.^{2,4,13} The use of
291 special stains is recommended mostly as a second step to Romanowsky-stained
292 standard smears using additional samples.^{2,14} In a clinical setting, however, exploitation
293 of tests all too often is limited by paucity of slides, poor preservation, low cellularity,
294 blood contamination and differences in yield and cell composition in between
295 consecutive samples.^{2,15,16} This limitation becomes most relevant in poorly accessible
296 tissues (e.g., CNS) and media (CSF, pericardial effusion) and in procedures inflicting a
297 high procedural morbidity (e.g., involving the heart, lungs, CNS). The diagnostician often
298 has to cope with single-slide settings, in which sequential tests to be carried out on the
299 same slides could possibly provide subcellular, molecular or metabolic details in context
300 with their cellular source.²

301 Ideally, the best cytological sample, exhibiting conspicuous changes, should also be
302 used for additional testing. This way, the cytological context is preserved, and the
303 information is not blurred by concomitant non-relevant cells such as peripheral blood
304 contamination.

305 Previous studies and case reports have demonstrated the feasibility of second-set
306 cytological, histological and histochemical staining of immunocytochemistry and in situ
307 hybridization (Table 1).^{1,17,18,19} Most of these investigations either did not use MWT or
308 coverslipping or did not evaluate the impact of MWT or coverslipping on staining results.
309 These studies were mainly carried out after removal of the previously used dye either by
310 using alcohol solutions, by bleaching in hydrochloric acid or, anecdotally, by microwave
311 treatment in citrate buffer and distilled water (Table 1).^{2,20,21} Only a few communications
312 spared these physicochemical maneuvers and performed immunostaining for a plethora
313 of nuclear, cytoplasmic, and membranous antigens in Papanicolaou-stained, May-
314 Grünwald Giemsa-stained and Diff-Quick-stained smears from various cancers (Table
315 1).^{1,17,19,22,23} Romanowsky stains are supposed to bind to distinguish cell components by
316 electrostatic forces only without impeding antibody binding by conformational changes of
317 target epitopes.^{1,24} This might be one of the reasons why May-Grünwald
318 Giemsa/Pappenheim, Hemacolor, Diff Quick and, as seen herein, modified Wright stains
319 do not preclude antigen detection.^{1,17,19,21,24,25} However, the time of storage and the
320 effect on ICC staining has been rarely addressed in PSICC studies (Table 1). In single
321 investigations, the storage of stained slides for more than 4 months or even more than
322 10 years was described. However, these slides all were coverslipped.^{10,21} In native air-
323 dried smears, antigenicity is preserved only for 4 weeks without any change in the
324 immunoreactivity.²⁶ If longer storage is needed, it is recommended that cytological slides
325 should be kept at -70°C.^{27,28} In the present study, it was proved mandatory after
326 cytochemical staining to shield the cytofilm from environmental influences by coverslipping if
327 immunostaining was delayed for more than one week after dye contact. The comparison

328 to unstained and coverslipped slides in this study indeed revealed that the decay of
329 antigenicity was directly associated with dye exposure and not with the destaining
330 procedure. Without coverslipping, the ionic dye components facilitate biomolecule
331 degradation in the smear by oxidative stress and other pathways.²⁹ If sealed under the
332 lid using a xylene-based mounting medium, the decrease in antigenicity was significantly
333 less and reached the levels of plain slides if they underwent microwave treatment in
334 citrate buffer after decoverslipping, destaining, and rehydration. That way, coverslipping
335 helped to overcome limitations by restricted freezer slots.

336 MWT-based antigen retrieval is a common procedure in the immunohistochemistry of
337 formalin-fixed tissue as it removes cross-linking of aldehyde bridges and thereby
338 recovers hidden epitopes.^{29,30} In immunocytology, MWT appears to increase antigen
339 detection thresholds after various ethanol and formalin fixation techniques.²⁹ Its utility in
340 non-fixed preparations has not been systematically tested before.^{1,12,17,19,21,28,31} In
341 contrast to fixed cytofilms³², common MWT protocols recommended for retrieval of
342 tissue antigens can be applied to recover nuclear, cytoplasmic, and membranous
343 antigens to a similar extent.¹ Moreover, air-drying alone minimizes the risk of irreversible
344 obliteration of nuclear epitopes by overfixation.²⁹

345 In stark contrast to the staining results for cellular antigens, PSICC appears to be
346 unsuitable for the detection of FCoV antigen in macrophages from effusions and CSF.
347 Each treatment cycle, including SDS, CDC, and MWT, leads to partial (MWT) or
348 complete (other procedures) abolishment of virus antigen detection, compared to that in
349 untreated sample pairs. Whether or not virus antigen preservation could possibly be

350 achieved by fixation of the smear before staining, as required for detecting other
351 microbial antigens such as Chlamydia³¹, is currently under investigation.

352 One limitation of this study is that no fixation was omitted, whereas other studies
353 propose fixation by formalin or ethanol to improve the ICC results.²⁹ The substatistical
354 number of samples in study B is a further limitation. Still, the results of the present study
355 provide evidence that viral antigens must be treated differently than cellular antigens.

356 In summary, PSICC is a sensitive, reliable, and reproducible method for the evaluation
357 of multiple cell and tissue markers. It allows a structured diagnostic approach with the
358 implementation of results from a preceding cytomorphological analysis. The yield of
359 staining, however, is antibody dependent. According to the results of this study, viral
360 antigens, such as of FCoV, may require dedicated preservation techniques.

361 **Acknowledgements**

362 We are grateful to the head technician of our Neuropathology & Cytology Lab, Mrs.

363 Karin Stingl, for excellent technical assistance.

364 **References:**

- 365 1. Beraki E, Olsen TK, Sauer T. Establishing a protocol for immunocytochemical
366 staining and chromogenic in situ hybridization of Giemsa and Diff-Quick prestained
367 cytological smears. *Cytojournal*. 2012;9:8.
- 368 2. Marcos R, Santos M, Santos N, et al. Use of destained cytology slides for the
369 application of routine special stains. *Vet Clin Pathol*. 2009;38(1):94-102.
- 370 3. McKee PH. Immunocytochemistry and cutaneous neoplasia ('something will turn up',
371 Micawber 1863). *Clin Exp Dermatol*. 1990;15(4):235-244.
- 372 4. Mandal PK, Mondal SK, Roy S, Adhikari A, Basu N, Sinha SK.
373 Immunocytochemistry: It's role in diagnosis of undifferentiated neoplasms by fine
374 needle aspiration cytology. *J Cytol*. 2013;30(2):121-124.
- 375 5. Dalquen P, Sauter G, Epper R, Kleiber B, Feichter G, Gudat F.
376 Immunocytochemistry in diagnostic cytology. *Recent Results Cancer Res*.
377 1993;133:47-80.
- 378 6. Höinghaus R, Hewicker-Trautwein M, Mischke R. Immunocytochemical
379 differentiation of neoplastic and hyperplastic canine epithelial lesions in cytologic
380 imprint preparations. *Vet J*. 2007;173(1):79-90.
- 381 7. Mason DY, Gatter KC. The role of immunocytochemistry in diagnostic pathology. *J*
382 *Clin Pathol*. 1987;40:1042-1054.
- 383 8. Ponce F, Magnol JP, Marchal T, et al. High-grade canine T-cell lymphoma/leukemia
384 with plasmacytoid morphology: a clinical pathological study of nine cases. *J Vet*
385 *Diagn Invest*. 2003;15(4):330-337.

- 386 9. Gründl S, Matiasek K, Matiasek L, et al. Diagnostic utility of cerebrospinal fluid
387 immunocytochemistry for diagnosis of feline infectious peritonitis manifesting in the
388 central nervous system. *J Feline Med Surg.* 2017;19(6):576-585.
- 389 10. Ives EJ, Vanhaesebrouck AE, Cian F. Immunocytochemical demonstration of feline
390 infectious peritonitis virus within cerebrospinal fluid macrophages. *J Feline Med Surg.*
391 2013;15(12):1149-1153.
- 392 11. Matiasek K, Pumarola M, Rosati M, et al. International Veterinary Epilepsy Task
393 Force recommendations for systematic sampling and processing of brains from
394 epileptic dogs and cats. *BMC Vet Res.* 2015;28(11):216.
- 395 12. Wünsche S, Rosati M, Matiasek K. Diagnostic yield and accuracy of postmortem
396 cytological sampling from the brain surface of animals with neurological
397 abnormalities. *Vet J.* 2016;211:57-63.
- 398 13. Grahn B, Peiffer R, Cullen C, Haines D. Classification of feline intraocular neoplasms
399 based on morphology, histochemical staining, and immunohistochemical labelling.
400 *Vet Ophthalmol.* 2006;9:395-403.
- 401 14. Lumsden JH, Baker R. Cytopathology techniques and interpretation. In: Baker R,
402 Lumsden JH, eds. *Color Atlas of Cytology of the Dog and Cat.* 1st ed. St. Louis, MO:
403 Mosby;2000:7-20.
- 404 15. Meinkoth JH, Cowell RL. Sample collection and preparation in cytology: increasing
405 diagnostic yield. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2002;32:1187-1207.
- 406 16. Tyler RD, Cowell RL, Baldwin CJ, Morton RJ. Introduction. In: Cowell RL, Tyler RD,
407 Meinkoth JH, eds. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat.* 2nd ed.
408 St. Louis, MO: Mosby; 1999:1-19.

- 409 17. Corkill ME, Katz R. Immunocytochemical staining of c-erb B-2 oncogene in fine-
410 needle aspirates of breast carcinoma: a comparison with tissue sections and other
411 breast cancer prognostic factors. *Diagn Cytopathol.* 1994;11(3):250-254.
- 412 18. Iwa N, Yutani C, Ishibashi-Ueda H, Katayama Y. Immunocytochemical
413 demonstration of glial fibrillary acidic protein in imprint smears of human brain
414 tumors. *Diagn Cytopathol.* 1988;4(1):74-77.
- 415 19. Nordgård S, Bofin A, Hagmar B. Ki-67 antigen detection in unstained and destained
416 cytological samples. *Ana Quant Cytol Histol.* 2002;24(4):198-204.
- 417 20. Chen JT, Lane MA, Clark DP. Inhibitors of the polymerase chain reaction in
418 Papanicolaou stain. Removal with a simple destaining procedure. *Acta Cytol.*
419 1996;40(5):873-877.
- 420 21. Shtilbans V, Szporm AH, Wu M, Burstein DE. p63 Immunostaining in Destained
421 Bronchoscopic Cytological Specimens. *Diagn Cytopathol.* 2005;32(4):198-203.
- 422 22. Choi US, Kim DY. Immunocytochemical detection of KI-67 in Diff-Quick-stained
423 cytological smears of canine mammary gland tumours. *Cytopathology.*
424 2011;22(2):115-120.
- 425 23. Kirbis IS, Flezar MS, Krasovec MU. MIB-1 immunostaining on cytological samples: a
426 protocol without antigen retrieval. *Cytopathology.* 2004;15(3):154-159.
- 427 24. Jörundsson E, Lumsden JH, Jacobs RM. Rapid staining techniques in cytopathology:
428 a review and comparison of modified protocols for hematoxylin and eosin,
429 Papanicolaou and Romanowsky stains. *Vet Clin Pathol.* 1999;28(3):100-108.
- 430 25. Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on
431 downstream staining procedures. *Methods.* 2014;70:12-19.

- 432 26. Aoki J, Sasaki N, Hino N, Nanba K. A study on the appropriate fixation for the
433 procedures for the better preservation of cellular antigenicity and morphology of the
434 blood smear in immunocytochemistry: an improvement of the immunostain technique
435 using alkaline-phosphatase (ALP) as a labeling enzyme. *Rinsho Ketsueki*.
436 1991;32(1):11-18.
- 437 27. Skoog L, Tani E. Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine
438 cytology. *Cytopathology*. 2011;22(4):215-229.
- 439 28. Suthipintawong C, Leong ASY, Vinyuvat S. Immunostaining of cell preparations: a
440 comparative evaluation of common fixatives and protocols. *Diagn Cytopathol*.
441 1996;15(2):167-174.
- 442 29. Ramos-Vara JA, Miller MA. When tissue and antibodies get along: revisiting the
443 technical aspects of immunohistochemistry – the red, brown, and blue technique. *Vet*
444 *Pathol*. 2014;51(1):42-87.
- 445 30. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J*
446 *Histochem Cytochem*. 2001;49(8):931-937.
- 447 31. Demirezen S, Kakudo K, Kawashima T, Katsuoka Y, Osamura RY.
448 Immunocytochemical detection of *Chlamydia trachomatis* on cytological specimens.
449 *Tokai J Exp Clin Med*. 1986;11(3):229-234.
- 450 32. Abendroth CS, Dabbs DJ. Immunocytochemical staining of unstained versus
451 previously stained cytologic preparations. *Acta Cytol*. 1995;39(3):379-386.
- 452 33. Oza N, Sanghvi K, Shet T, et al. Mammary analogue secretory carcinoma of parotid:
453 Is preoperative cytological diagnosis possible? *Diagn Cytopathol*. 2016;0(0):1-7.

- 454 34. Kim DH, Kwon MS. Role of fine needle aspiration cytology, cell block preparation and
455 CD63, P63 and CD56 immunostaining in classifying the specific tumor type of the
456 lung. *Acta Cytol.* 2010;54(1):55-59.
- 457 35. Cheng L, Reiter RE, Jin Y, et al. Immunocytochemical analysis of prostate stem cell
458 antigen as adjunct marker for detection of urothelial transitional cell carcinoma in
459 voided urine specimens. *J Urol.* 2003;169(6):2094-2100.
- 460 36. Darvishian F, Stier EA, Soslow RA, Lin O. Immunoreactivity of p16 in anal cytology
461 specimens: histologic correlation. *Cancer.* 2006;108(1):68-71.
- 462 37. Zhang L, Krausz T, DeMay RM. A pilot study of Galectin-3, HBME-1, and p27 triple
463 immunostaining pattern for diagnosis of indeterminate thyroid nodules in cytology
464 with correlation to histology. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2015;23(7):481-
465 490.
- 466 38. Cajulis RS, Szumel R, Frias-Hidvegi D, Combs SG, Radosevich JA. Monoclonal
467 antibody 44-3A6 as an adjunct in cytodiagnosis of adenocarcinomas in body fluids.
468 *Diagn Cytopathol.* 1993;9(2):179-183.
- 469 39. Dabbs DJ, Wang X. Immunocytochemistry on cytologic specimens of limited
470 quantity. *Diagn Cytopathol.* 1998;18(2):166-169.

471 Table 2. Trial 1 to trial 6 with different pretreatments.

	Number of total slides	cat/pig	modWS ^a	CS ^b	MWT ^c during CS	De-CS ^b	De- staining	MWT ^c + ^d –	Number of slides for each primary AB ^a (NeuN ^q /GFAP ^q /CD3)
Trial 1	30	15/15	+	–	–	–	–	0 30	– –
Trial 2	24	12/12	+	+	+	+	+	12/24 12/24	4 4
Trial 3	24	12/12	+	–	–	–	+	12/24 12/24	4 4
Trial 4	36	18/18	+	+	–	+	+	18/36 18/36	6 6
Trial 5	36	18/18	–	+	–	+	–	18/36 18/36	6 6

472

	Trial 6	24	12/12	-	-	-	-	-	12/24	4
									12/24	4
473	Numbers without negative controls (n = 12), ^a modified Wright's stain, ^b coverslipping, ^c microwave treatment, ^d number of slides treated with									
474	microwave (+) and without microwave (-) for cat and pig together, ^e antibody, ^f neuronal nuclei, and ^g glial fibrillary acidic protein.									

475 Table 3. Primary antibodies used in studies A and B.

Target antigen	Type/clone	Target	Subcellular localization	Manufacturer
CD3 (ϵ chain)	Polyclonal Rabbit Catalogue no. A0452	T lymphocyte	Plasmalemma	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
NeuN ^a	Monoclonal Mouse Clone A60 MAB377	Neurons	Nucleus	Millipore Chemicon USA & Canada
GFAP ^b	Polyclonal Rabbit Z0334	Astrocytes	Cytoplasm	DakoCytomation DK-2500 Glostrup Denmark
Feline Coronavirus	Monoclonal Mouse Clone FIPV3-70 ^c MAK2194	FIPV ^c type 1 and 2	Nucleocapsid	Linaris GmbH Dossenheim Germany

476 ^aneuronal nuclear antigen; ^bglial fibrillary acidic protein, and ^cfeline infectious peritonitis virus.

477 **Table 4.** Median scores of trial 6 with and without microwave treatment.

478

	Antibody	Cell specificity	Intensity	Background	Unspecific staining
Trial 6	NeuN ^a	3.0 ± 0.0 ^d	2.5 ± 0.58	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	GFAP ^b	3.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0*	1.5 ± 0.58	0.0 ± 0.5
	CD3	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.5
Trial 6 with MWT ^c	NeuN ^a	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	0.5 ± 0.58	0.0 ± 0.5
	GFAP ^b	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	2.0 ± 0.82	1.0 ± 0.5
	CD3	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

479 ^aneuronal nuclear antigen; ^bglial fibrillary acidic protein, ^cmicrowave treatment, ^dstandard deviation,

480 *significant difference between with MWT and without MWT

481 **Table 5.** Median scores of trial 5 with and without microwave treatment.

482

	Antibody	Cell specificity	Intensity	Background	Unspecific staining
Trial 5	NeuN ^a	2.0 ± 0.5 ^{d*}	1.0 ± 0.5 [*]	1.0 ± 0.5 ^o	0.0 ± 0.0 ^o
	GFAP ^b	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0 ^o	3.0 ± 0.0	0.5 ± 0.58 ^o
	CD3	1.5 ± 0.58	1.5 ± 0.58	0.5 ± 0.58 ^o	0.0 ± 0.0 ^o
Trial 5 with MWT ^c	NeuN ^a	3.0 ± 0.0 ^o	2.5 ± 0.58 ^o	0.0 ± 0.5 ^o	0.0 ± 0.5 ^o
	GFAP ^b	2.5 ± 0.58 ^o	2.5 ± 0.58 ^o	2.5 ± 0.58 ^o	0.0 ± 0.0 ^o
	CD3	1.5 ± 0.58	1.5 ± 0.58	0.0 ± 0.0 ^o	0.0 ± 0.0 ^o

483 ^aneuronal nuclear antigen; ^bglial fibrillary acidic protein, ^cmicrowave treatment, ^dstandard deviation,

484 ^{*}significant difference between with MWT and without MWT, and ^ono significant difference compared to

485 trial 6.

486 **Table 6.** Median scores of trial 3 with and without microwave treatment.

487

	Antibody	Cell specificity	Intensity	Background	Unspecific staining
Trial 3	NeuN ^a	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 ^o	0.0 ± 0.0 ^o
	GFAP ^b	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.5 ± 0.58 ^o	0.0 ± 1.0 ^o
	CD3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.58 ^o	0.0 ± 0.0 ^o
Trial 3 with MWT ^c	NeuN ^a	0.5 ± 0.58	0.5 ± 0.58	0.0 ± 0.5 ^o	0.0 ± 0.5 ^o
	GFAP ^b	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0 ^o	0.0 ± 0.5 ^o
	CD3	1.0 ± 0.82	1.0 ± 0.5	0.5 ± 0.58 ^o	0.0 ± 0.5 ^o

488 ^aneuronal nuclear antigen; ^bglial fibrillary acidic protein, ^cmicrowave treatment, ^dstandard deviation,

489 ^{*}significant difference between with MWT and without MWT, and ^ono significant difference compared to

490 trial 5.

491 **Table 7.** Median scores of trial 2/4 with and without microwave treatment.

492

	Antibody	Cell specificity	Intensity	Background	Unspecific staining
Trial 2/4	NeuN ^a	1.0 ± 0.0 ^{d*}	1.0 ± 0.0 [*]	0.0 ± 0.0 ^o	0.0 ± 0.35 ^o
	GFAP ^b	1.0 ± 1.03 [*]	1.5 ± 0.99 ^{*o}	3.0 ± 0.46	0.0 ± 0.76 ^o
	CD3	1.0 ± 0.46 [*]	1.0 ± 0.46 [*]	0.5 ± 0.53 ^{*o}	0.0 ± 0.35 ^o
Trial 2/4 with MWT ^c	NeuN ^a	3.0 ± 0.0 ^o	3.0 ± 0.46 ^o	0.0 ± 0.52 ^o	0.0 ± 0.0 ^o
	GFAP ^b	3.0 ± 0.0 ^o	3.0 ± 0.35	3.0 ± 0.0	1.0 ± 0.76 ^o
	CD3	3.0 ± 0.46 ^o	2.0 ± 0.52 ^o	0.0 ± 0.0 ^o	0.0 ± 0.46 ^o

493 ^aneuronal nuclear antigen, ^bglial fibrillary acidic protein, ^cmicrowave treatment, ^dstandard deviation,

494 ^{*}significant difference between with MWT and without MWT, and ^ono significant difference compared to

495 trial 6.

496 **Table 8.** Median scores of all trials with different pretreatments for feline coronavirus
 497 antigen detection.

	Cell specificity	Intensity	Background	Unspecific staining
Trial 6	3.0 ± 0.0^b	2.0 ± 1.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Trial 6 with MWT ^a	0.0 ± 1.73	0.0 ± 0.58	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Trial 5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.58	0.0 ± 0.58
Trial 5 with MWT ^a	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.58	0.0 ± 1.15
Trial 4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Trial 4 with MWT ^a	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.58	0.0 ± 0.0
Trial 3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Trial 3 with MWT ^a	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

498 ^amicrowave treatment and ^bstandard deviation.

499 **Figure legends:**

500 **Figure 1.** Schematic illustration of the staining trials.

501 Trial 1: Slides were stained and coverslipped. These slides served for the
502 cytomorphological evaluation.

503 Trial 2: The procedure included staining, coverslipping and microwave treatment of the
504 slides. After storage and directly before immunocytochemistry, these specimens were
505 decoverslipped and destained, and half of the slides were again microwave treated.

506 Trial 3: Slides were only stained and stored afterwards. Before immunocytochemistry,
507 the slides were destained, and half of them were microwave treated.

508 Trial 4: Slides were stained and coverslipped. After storage and directly before
509 immunocytochemistry, they were decoverslipped and destained, and half of them were
510 microwave treated.

511 Trial 5: This procedure included only coverslipping of the slides. Before
512 immunocytochemistry, they were decoverslipped, and half of them were microwave
513 treated.

514 Trial 6: On these specimens, no pretreatment was done, and they were stored frozen.
515 Only half of them were pretreated in the microwave before immunocytochemistry. These
516 plain slides served as the gold standard.

517

518 **Figures 2A-E.** Outcome of ICC for cellular antigens (blue arrows: specific staining; black
519 arrows: immunonegative cells). Counterstaining with Mayer's hemalum.

520 **A:** ICC on plain cytofilms serves as the gold standard. This figure illustrates the optimal
521 staining results. The CD3 signal was strongest in the periphery of the lymphocyte

cytoplasm close to the membrane. NeuN immunoreactivity was restricted to neuronal nuclei, while GFAP diffusely stained the soma and fragmented processes of astrocytes. (procedure depicted in Trial 6 without microwave treatment)

B: The impact of xylene-based coverslipping and decoverslipping appeared negligible. Hence, microwave treatment was not necessary (procedure depicted in Trial 5 without microwave treatment).

C: Cytostaining and bleaching with HCl abolished the specific immunostaining of all markers (blue arrow) if the slides were left uncoverslipped (procedure depicted in Trial 3 without microwave treatment).

D: Coverslipping upon cytostaining appeared superior with regard to preservation of antigenicity and specific staining intensity (procedure depicted in Trial 4 without microwave treatment).

E: Microwave treatment, however, rescued the compromising effects of staining/de-staining and coverslipping/de-coverslipping completely (procedure depicted in Trial 4 with microwave treatment).

Figures 3A & B. Impact of pretreatments on ICC for FCoV. Counterstaining with Mayer's hemalum.

A: Only direct ICC of unstained slides allowed reliable immunodetection (blue arrow). All other physiochemical maneuvers carried out on unstained slides completely abolished FCoV immunoreactivity.

B: The same held true for panoptic staining, bleaching, coverslipping and decoverslipping. Even microwave treatment failed to rescue antigenicity.

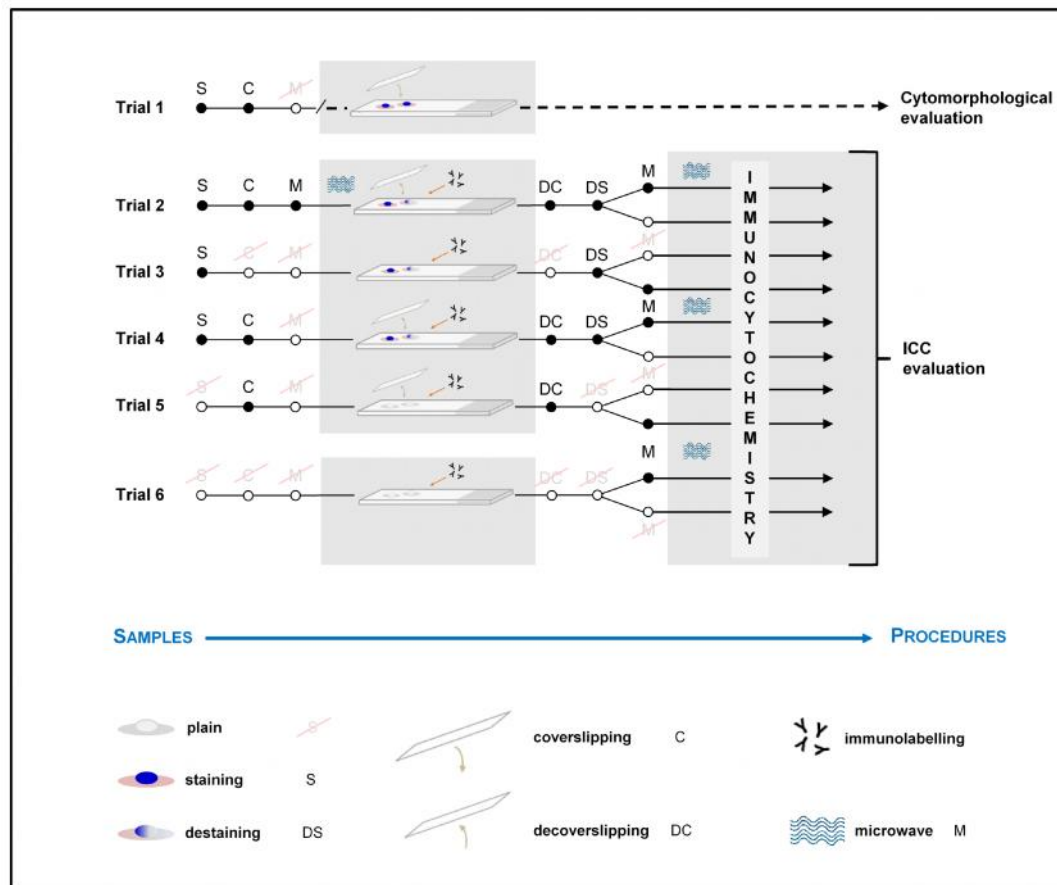


Figure 1

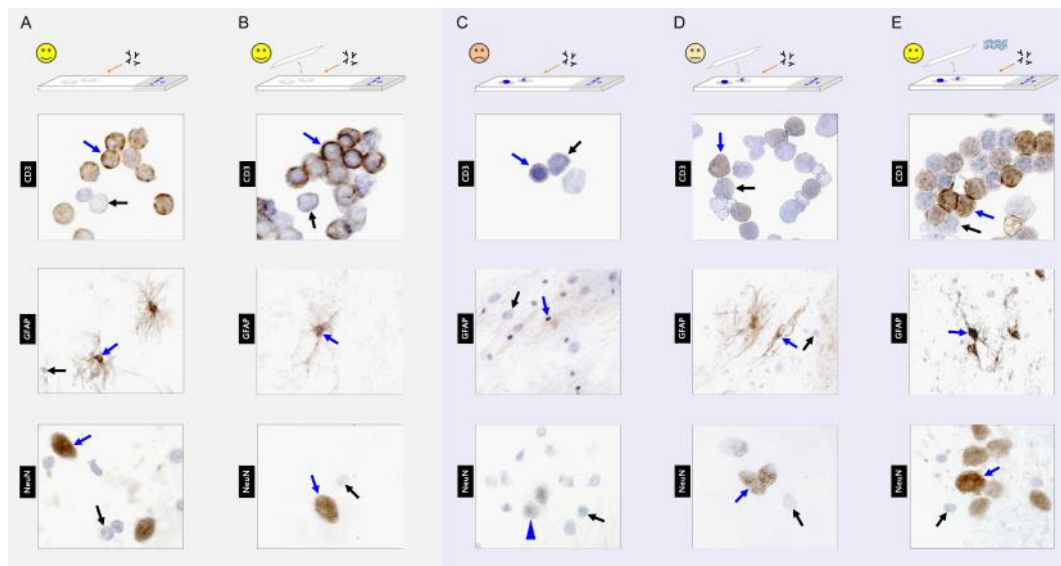


Figure 2

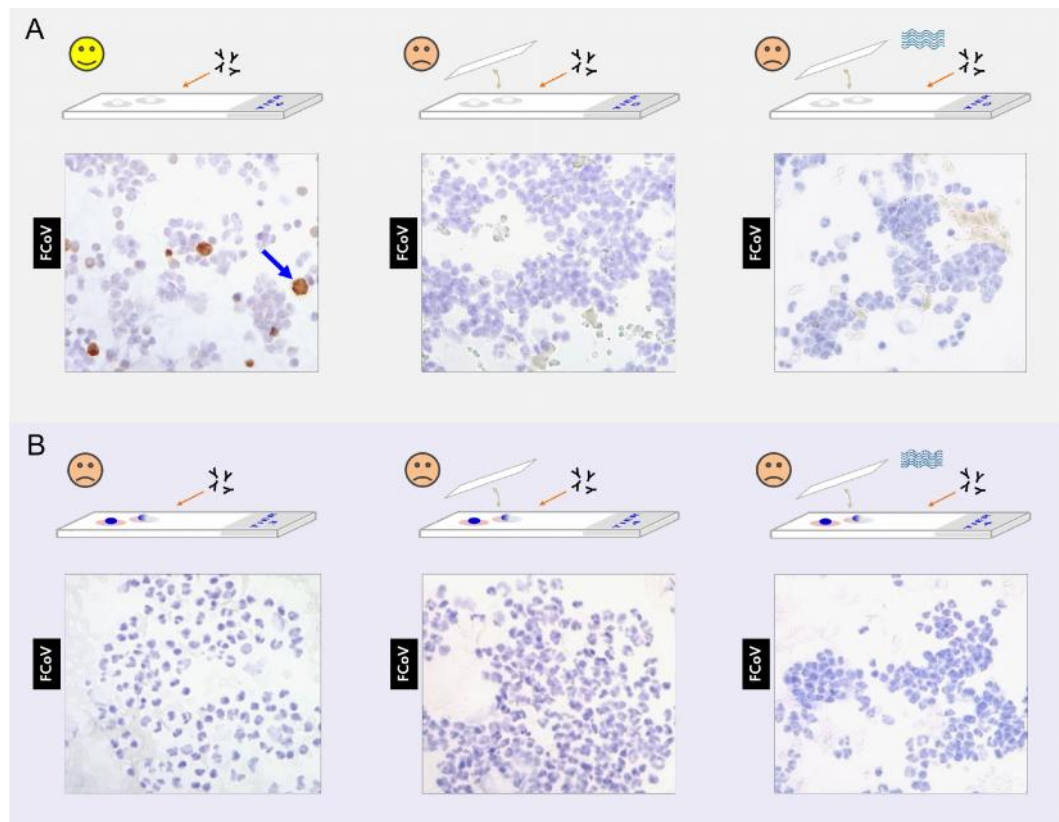


Figure 3

IV. ERWEITERTE DISKUSSION DER STUDIE I

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die IZC aus Liquor zum Nachweis der ZNS-Manifestation einer FIP zu evaluieren. Leider sind die Liquormengen, die Katzen entnommen werden können, begrenzt. Die empfohlene Liquormenge, die maximal entnommen werden darf, ohne dem Tier zu schaden, liegt bei 1 ml pro 5 kg Körpergewicht (DEWEY & DUCOTÉ, 2008). Bei der Untersuchung von Liquorproben neurologischer Patienten werden die Proben zur möglichst breiten Abdeckung der möglichen Differentialdiagnosen mit konventionellen zytologischen Färbungen, wie zum Beispiel der Wright-Färbung, der Hämatoxylin-Eosin-Färbung oder der panoptischen Färbung nach Pappenheim, untersucht, weshalb sie dann nicht mehr zur IZC-Analyse zu Verfügung stehen. Aufgrund der geringen gewinnbaren Liquormengen und aufgrund der Tatsache, dass Liquor für Untersuchungszwecke ein sehr instabiles Medium ist (FRY et al., 2006), wurden für die Versuchsanordnung zur Evaluierung der Durchführbarkeit der IZC nach konventioneller zytologischer Färbung Lymphknotenfeinnadelaspirations- und Gehirnapklatschzellproben mit zellulären Antigenen verwendet. Danach wurde diese Methode auf Körperhöhlenergussproben, die das FCoV-Antigen enthalten, übertragen. Dafür wurden verschiedene Vorbehandlungen der Zellproben, wie die Mikrowellenbehandlung und die Asservierung des Antigens in einem Einbettmedium mittels Eindeckeln, untersucht, mit dem Ziel einer optimalen Erhaltung der Antigenität der Zellproben. Diese Vorbehandlungen wurden an konventionell gefärbten Zellproben und an ungefärbten Proben durchgeführt und mit dem Goldstandard der IZC an eingefrorenen, ungefärbten Zellproben verglichen.

Wurde die IZC an Lymphknotenfeinnadelaspirations- und Gehirnapklatschzellproben nach konventioneller zytologischer Färbung mit modifizierter Wright-Färbung (modWS) durchgeführt, waren Intensität und zelluläre Spezifität vergleichbar zum Goldstandard der IZC aus gefrorenem, ungefärbtem Material. Dies war allerdings nur der Fall, wenn die gefärbten Proben direkt nach der modWS eingedeckelt und unmittelbar vor der Durchführung der IZC – nach Entdeckungelung in Xylol und Entfärbung in 1%igem Chlorwasserstoff (HCl) – in der Mikrowelle zur Antigenmaskierung vorbehandelt wurden. Wurde die IZC allerdings an modWS-gefärbten Proben ohne weitere Vorbehandlungen

wie Eindeckeln oder Mikrowellenbehandlung durchgeführt, sank die Intensität der IZC nach Entfärbung der Präparate signifikant für alle Antikörper im Vergleich zu eingefrorenen, ungefärbten Proben. Im Gegensatz zu zellulärem Antigen wurde die Immunreaktivität von viralem Antigen jedoch durch jegliche Vorbehandlung, wie konventionelle zytologische Färbung, Eindeckeln und Mikrowellenbehandlung, zerstört, und die viralen Antigene konnten dann mittels der IZC nicht mehr nachgewiesen werden.

Nicht nur bei der Entnahme von Liquor, sondern auch bei der Probenentnahme von schwer zugänglichen Organen, wie ZNS-Gewebe oder von verschiedenen Tumoren, ist die Anzahl und Menge der zu gewinnenden Proben limitiert. Die zytologische Untersuchung mit konventionellen Färbungen stellt bei solchen Proben die beste Option in der diagnostischen Aufarbeitung dar (JORUNDSSON et al., 1999; BERAKI et al., 2012). Die Möglichkeit der Anwendung spezieller Untersuchungen, wie die IZC, an solch schwer zugänglichen Organen ist daher ebenso begrenzt (DABBS & WANG, 1998). Die IZC wird vor allem zur Immunphänotypisierung und Klassifizierung von Lymphomen sowie zur Differenzierung, Subklassifizierung und Subtypisierung anderer Tumore genutzt (MASON & GATTER, 1987; MCKEE, 1990; HOINGHAUS et al., 2002). Ist die Morphologie der Zellprobe schlecht erhalten oder fehlen die für die Diagnostik spezifischen Zellen in der Zellprobe, hilft die IZC zur Diagnosefindung (MASON & GATTER, 1987). Weiterhin können mit diesem Verfahren Zellen, die nur in geringer Zahl vorliegen und die in konventionell gefärbten Präparaten schlecht erkennbar sind, identifiziert werden (ADAMS et al., 1984; DEMIREZEN et al., 1986; MASON & GATTER, 1987; MONACO & DABBS, 2015). Da sich die Proben untereinander in Zellularität, Verschmutzung, individueller Zellpopulation und Morphologie stark unterscheiden, erleichtert es die Diagnosefindung, die IZC direkt an zuvor konventionell gefärbten Präparaten, in denen spezielle Veränderungen zu sehen waren, durchzuführen (MEINKOTH & COWELL, 2002; MARCOS et al., 2009). Aus diesem Grund beschäftigten sich verschiedene Studien mit der Durchführung der IZC und anderer Spezialfärbungen an bereits gefärbten Zellpräparaten (ABENDROTH & DABBS, 1995; NORDGARD et al., 2002; MARCOS et al., 2009; CHOI & KIM, 2011; BERAKI et al., 2012). In verschiedenen Tumor-Studien wurden Färbungen, wie die May-Grünwald-Giemsa-(MGG), die Diff-Quick-(DQ) und die Papanikolaou-(PAP)-Färbung und

nachfolgend die IZC an diesen gefärbten Proben getestet (IWA et al., 1988; CAJULIS et al., 1993; CORKILL & KATZ, 1994; ABENDROTH & DABBS, 1995; DABBS & WANG, 1998; EJERSBO et al., 1999; KOYATSU et al., 1999; NORDGARD et al., 2002; CHENG et al., 2003; KRISHNAMURTHY et al., 2003; KIRBIS et al., 2004; SHTILBANS et al., 2005; DARVISHIAN et al., 2006; KIM & KWON, 2010; CHOI & KIM, 2011; BERAKEI et al., 2012; ZHANG et al., 2015; OZA et al., 2016). Dabei wurden die Zellproben in den meisten Studien mit verschiedenen Medien fixiert und nach konventioneller Färbung eingedeckelt. In manchen Studien wurden die Proben vor der IZC wieder entfärbt und einer hitzeinduzierten Antigendemaskierung (heat induced antigen retrieval, HIAR) unterzogen. Antikörper, die in diesen Studien verwendet wurden, waren gegen nukleäre, zytoplasmatische und membranöse Antigene gerichtet. In diesen Studien wurde gezeigt, dass eine IZC nach konventioneller zytologischer Färbung in den meisten Fällen möglich ist. Nach PAP soll die IZC ohne Probleme durchführbar sein, wohingegen sich die IZC nach MGG oder DQ schwierig gestaltete (EJERSBO et al., 1999; KOYATSU et al., 1999; KRISHNAMURTHY et al., 2003; KIRBIS et al., 2004). BERAKEI und Mitarbeiter (2012) demonstrierten in ihrer Studie die Bedeutung der Stärke und Dauer der vorgeschalteten Mikrowellenbehandlung sowie die Auswahl des verwendeten Mediums zur HIAR für optimale Ergebnisse der IZC (BERAKEI et al., 2012). Die Untersuchungen wurde mit nukleären Antikörpern (Ki-67, Östrogen-Rezeptor-Antikörper, Progesteron-Rezeptor-Antikörper), einem zytoplasmatischen Antikörper (Panzytokeratin-Antikörper) und einem membranösen Antikörper (E-cadherin-Antikörper) durchgeführt. Optimale Ergebnisse der IZC wurden für alle Antikörper mit einer HIAR mittels Mikrowellenbehandlung mit niedriger Leistung (750 Watt) und kurzer Dauer (2,5 Minuten), gefolgt von einem zweiten Zyklus (6 Minuten bei 160 Watt) erzielt. Als bestes Medium für die HIAR erwies sich der Tris-EDTA-(Trismethylamin Ethylendiamintetraacetat)-Puffer. Er war besser geeignet, als der Zitratpuffer. Bei Verwendung einer stärkeren Mikrowellenbehandlung von zweimal 5 Minuten bei 750 Watt in Tris-EDTA-Puffer ergab die IZC des Ki-67-Antikörpers bereits suboptimale Ergebnisse, alle anderen Antikörper konnten sogar gar nicht dargestellt werden. Wurde die Mikrowellenbehandlung in Zitratpuffer durchgeführt, konnte bei allen Antikörpern auch nach verschiedenen starken Mikrowellenbehandlungen keine IZC-Farbreaktion dargestellt werden. Für die Versuchsdurchführung wurden in dieser Studie die zytologischen Zellproben in Ethanol fixiert und vor der IZC

entfärbt (BERAKI et al., 2012). KIRBIS und Mitarbeiter (2004) stellten in ihren IZC-Untersuchungen von humanen Mammatumoren mit dem nukleären Antikörper MIB-1 fest, dass eine HIAR mittels Mikrowellenbehandlung bei PAP-gefärbten Präparaten für positive Resultate essentiell ist (KIRBIS et al., 2004). ABENDROTH und DABBS (1995) untersuchten ebenfalls den Effekt einer PAP-Färbung auf die IZC-Ergebnisse (ABENDROTH & DABBS, 1995). Alle Zellproben wurden in 95%igem Alkohol oder per Lufttrocknung fixiert. Danach wurde ein Teil dieser Proben ungefärbt belassen und ein weiterer Teil mit PAP gefärbt und eingedeckelt. Die IZC wurde an gefärbten, entdeckelten Präparaten und an in HCl (Chlorwasserstoff) entfärbten, entdeckelten Präparaten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit der IZC der ungefärbten Präparate verglichen. In 76 % der PAP-gefärbten Zellproben, die vor der IZC nicht entfärbt worden waren, sowie in 72 % der zuvor entfärbten Proben, waren die Färbeergebnisse äquivalent zu den IZC-Ergebnissen der ungefärbten zytologischen Präparate. Eine HIAR wurde dabei nicht angewendet (ABENDROTH & DABBS, 1995).

Zur Evaluation der Ergebnisse der vorliegenden Studie wurde ein 4-Punkte-System verwendet, in dem Werte von 0 keine IZC-Färbbarkeit und Werte von 3 optimale Resultate bedeuteten. In der vorliegenden Studie hatte die modWS eine starke negative Auswirkung auf die Immunreaktivität der Zellproben. Die Intensität der IZC-Färbung sank nach konventioneller zytologischer Färbung von maximal zu erreichenden medianen Werten von 3 bei ungefärbten, eingefrorenen Proben auf mediane Werte von 0 nach modWS der Präparate, bei denen also eine IZC-Färbung nicht mehr darstellbar war. Es ist bekannt, dass panoptische Färbungen eine Auswirkung auf Zellen haben (JORUNDSSON et al., 1999; BERAKI et al., 2012). Jeder Farbstoff hat prinzipiell die Tendenz, von der Färbelösung in die Zelle zu wandern und somit die Zellen zu färben (BERAKI et al., 2012). Zytologische Färbelösungen, wie PAP und Romanowsky-Giemsa-(RG)-Färbungen, eine Modifikation der Romanowsky-Färbung (RF), beinhalten ein Gemisch von sauren, negativ geladenen und basischen, positiv geladenen Farben. Nach dem Coulombschen Gesetz entstehen entgegengesetzte elektrische Kräfte zwischen diesen ionischen Färbungen und den zellulären Bestandteilen (BERAKI et al., 2012). Bestandteile der RF, zu der auch die modWS zählt, binden demnach über elektrische Kräfte an bestimmte Zellkomponenten, ohne die Antigenbindung zu verhindern (JORUNDSSON et al., 1999; BERAKI et al., 2012). RF besitzen eine

komplexe chemische Zusammensetzung. Sie bestehen aus der positiv geladenen, basischen Farbe Methylenblau, sowie aus der negativ geladenen, sauren Farbe Eosin Y. Weiterhin sind die Abbauprodukte von Methylenblau, nämlich Azur A, B oder C, enthalten (JORUNDSSON et al., 1999). Im Gegensatz zu den chemisch stabileren Färbelösungen, wie PAP und Hämatoxylin-Eosin, reagiert die RF sensibel auf pH-Wert, Temperatur, Puffer, Farbkonzentration und Fixation (JORUNDSSON et al., 1999). Somit könnte in der vorliegenden Studie die modWS an sich oder das Verfahren ohne Fixierung letztendlich eine Auswirkung auf die Immunreaktivität gehabt haben. Da nach Eindeckeln der gefärbten Proben die Immunreaktivität noch vorhanden war, ist dies in der vorliegenden Studie jedoch unwahrscheinlich.

Wie in früheren Studien beschrieben, konnten die modWS-gefärbten Zellproben mittels HCl erfolgreich entfärbt werden (MARCOS et al., 2009). Allerdings kann eine Entfärbung mit HCl auch die Immunreaktivität reduzieren. RAMOS-VARA und MILLER (2014) beschrieben bei Verwendung von HCl in dekalzifizierenden Lösungen eine Reduktion der Immunreaktivität bei einigen Antikörpern innerhalb eines Tages. Nach einer Woche war keine Immunreaktivität mehr nachweisbar (RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Durch saure Fixationsmedien wurde die Immunreaktivität aufgrund der reduzierten Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Antikörpern während der IZC ebenfalls vermindert. Daher sollte zur Erhaltung einer IZC-Färbung eine HIAR durchgeführt werden (RAMOS-VARA & MILLER, 2014). In der vorliegenden Studie wurde eine niedrige HCl-Konzentration von 1 % über eine kurze Zeit von maximal 10 Minuten verwendet. Dies sollte keine relevante Auswirkung auf die Immunreaktivität gehabt haben (BERAKI et al., 2012).

In vielen Studien wird die Fixierung von Zellproben empfohlen (ADAMS et al., 1984; IWA et al., 1988; CAJULIS et al., 1993; CORKILL & KATZ, 1994; DABBS & WANG, 1998; NORDGARD et al., 2002; CHENG et al., 2003; KIRBIS et al., 2004; DARVISHIAN et al., 2006; KIM & KWON, 2010; CHOI & KIM, 2011; BERAKI et al., 2012; ZHANG et al., 2015; OZA et al., 2016). In der vorliegenden Studie wurden die Zellproben ausschließlich luftfixiert. Dies könnte die Resultate der IZC negativ beeinflusst haben. In der immunhistochemischen Untersuchung von Gewebsschnitten ist die Fixierung zum Erhalt der Zellkomponenten, zur Prävention der Autolyse und der Verlagerung der Zellzusammensetzungen in Hinblick auf Antigene und Enzyme, zur Stabilisierung des zellulären Materials und

zur Intensivierung der konventionellen und der immunhistochemischen Färbung von Bedeutung (HAYAT & GIAQUINTA, 1970; RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Sowohl eine zu frühzeitige Fixierung nach Entnahme der Proben als auch eine zu späte Fixierung nach zu langer Lagerung können dabei die Immunreaktivität vermindern (RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Nach Entnahme von Proben aus dem lebenden Organismus kommt es zu biochemischen Veränderungen, die eine Adenosin-Triphosphat-Depletion und den Zusammenbruch des Natrium-, Kalium- und Kalziumgradienten beinhalten (HEWITT et al., 2011). Je länger die Fixierung aufgeschoben wird, desto länger besteht eine Hypoxie. Die Folge ist eine Schwellung der Zellen und die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen sowie eine Aktivierung von Enzymen, was wiederum die Immunreaktivität der Zielzellen verändert (ESPINA et al., 2009; HEWITT et al., 2011). Speziell in der Tumordiagnostik kann eine verspätete Fixierung der Präparate den Mitose-Index um bis zu 40 % reduzieren und damit die Sensitivität zur Diagnostik von Neoplasien vermindern (CROSS et al., 1990). Eine Überfixierung kann die IZC-Färbung aufgrund von exzessiven Quervernetzungen zwischen Aminosäuren und dem Fixationsmedium unmöglich machen. Dieser Effekt ist von der zellulären Lokalisation abhängig. So wird zum Beispiel die nukleäre Färbung mittels des Antikörpers B-Zelllymphom 2 (Bcl-2) komplett und irreversibel aufgehoben. Nicht einmal die Anwendung einer HIAR mittels Mikrowellenbehandlung, welche die Quervernetzungen in den meisten Fällen aufhebt, konnte dies verhindern. Die Färbung mit zytoplasmatischen Antikörpern ist nach einer HIAR jedoch noch möglich (RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Derzeit gibt es kein Standardfixationsprotokoll für Zellproben. Welches Fixationsmedium verwendet wird, sollte vom zytologischen Verfahren und vom Antigen abhängig gemacht werden. Für die IZC sollten die Präparate auf Alkoholbasis oder in Formalin nassfixiert werden. Alternativ ist eine primäre Luftfixierung mit nachfolgender Fixierung mit 100 % Aceton oder 10 % Formalin unmittelbar vor der IZC möglich (RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Während die Art der Fixierung für membranöse und zytoplasmatische Antigene meist nicht relevant ist, liefert die IZC von luftgetrockneten Präparaten mit nukleären Antigenen optimale Resultate nach Fixierung in neutral gepuffertem 4%igem oder 10%igem Formalin allein oder gefolgt von Methanol-Aceton-Fixierungstechniken (SKOOG & TANI, 2011; RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Allerdings kann Aceton durch Auflösung der Zellmembranen und Auswärtsdiffusion von Peptiden aus der Zelle auch zu falsch

negativen Ergebnissen in der IZC führen. Zudem führt Aceton bei Verwendung automatischer Färbemaschinen zu Zellverlusten in Zellproben (RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Es ist zu bedenken, dass in der vorliegenden Studie die alleinige Luftfixation die Ergebnisse verfälscht haben kann. Mit einer Nassfixation auf Alkoholbasis hätte die Immunreaktivität des FCoV-Antigens eventuell besser erhalten werden können. In einer Studie von ADAMS und Mitarbeitern (1984) konnte das dort untersuchte Herpesvirus in der IZC nur nach Fixation der Zervixzellproben in Ethanol oder Aceton mit optimalen Ergebnissen dargestellt werden (ADAMS et al., 1984). Beachtet werden muss, dass Viruspartikel bei fehlender Fixation grundsätzlich anfälliger für Autolyse sind als Protozoen oder Pilze (HEWITT et al., 2011).

Zusätzlich zur Alkoholfixierung kann eine HIAR die Resultate der IZC verbessern. Für die meisten nukleären Antigene wird dafür eine Mikrowellenbehandlung in Zitratpuffer empfohlen. Zytoplasmatische und membranöse Antigene hingegen benötigen zur Erhaltung einer optimalen Immunreaktivität selten eine Mikrowellenbehandlung (RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Zur immunhistochemischen Untersuchung von Gewebeschnitten wird bei den meisten Antikörpern eine Mikrowellenbehandlung für 20 Minuten bei 90–95 °C empfohlen (RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Allerdings kann die Mikrowellenbehandlung bei Zellproben die Immunreaktivität auch negativ beeinflussen. BERAKI und Mitarbeiter (2012) stellten fest, dass durch eine Mikrowellenbehandlung in Zitratpuffer (2 x 5 Minuten bei 750 Watt) die IZC-Färbung von den nukleären Antikörpern, Progesteron-Rezeptor- und Östrogen-Rezeptor-Antikörpern aufgehoben und die IZC-Färbung des nukleären Antikörpers Ki-67 reduziert wurde (BERAKI et al., 2012). Mit geringerer Stärke der Mikrowellenbehandlung (2,5 Minuten bei 750 Watt, gefolgt von 6 Minuten bei 160 Watt) in Tris-EDTA-Puffer wurden bei den Zellproben optimale Ergebnisse in der IZC gefunden (BERAKI et al., 2012). In der vorliegenden Studie wurde eine stärkere Mikrowellenbehandlung in Zitratpuffer durchgeführt (5 Minuten bei 800 Watt, gefolgt von 20 Minuten bei 250 Watt). Für die verwendeten zellulären Antigene CD-3, neuronales nukleäres Protein (NeuN) und gliales fibrilläres saures Protein (GFAP) war diese Form der HIAR effektiv und brachte optimale Resultate. Für das FCoV-Antigen in Körperhöhlenergussproben hätten niedrigere Mikrowellenstärken ausreichen können. In zukünftigen Untersuchungen sollte die Mikrowellenbehandlung für das FCoV-Antigen in anderen Puffern, wie

beispielsweise Tris-EDTA-Puffer, evaluiert werden. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass unterschiedliche Antikörper jeweils unterschiedliche Puffer und unterschiedliche pH-Werte der Puffer für die HIAR benötigen (SHI et al., 2001; BERAKEI et al., 2012; RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Der Effekt der chemischen Zusammensetzung von Puffern zur HIAR ist unbekannt. Für die meisten Antigene wird jedoch eine Mikrowellenbehandlung in Zitratpuffer empfohlen, wie sie auch in der vorliegenden Studie verwendet wurde (RAMOS-VARA & MILLER, 2014). RAMOS-VARA und MILLER (2014) merken allerdings an, dass für die IZC von nukleären Antigenen Puffer mit niedrigem pH-Wert von Vorteil sind (RAMOS-VARA & MILLER, 2014).

Für die kurzzeitige Lagerung von zytologischen Proben von weniger als zwei Wochen werden Temperaturen von 2–8 °C empfohlen. Bei längerer Lagerung sollten die Präparate bei –70 °C eingefroren werden oder mit einem Deckglas, eingebettet in einem 3%igem Polyethylenglykol-Medium, versehen werden (HEWITT et al., 2011; KIRBIS et al., 2011; SKOOG & TANI, 2011; RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Das Einbettmedium im Rahmen des Eindeckelns von Zellproben bewahrt die Antigenität. In der vorliegenden Studie konnte durch das Eindeckeln der Zellproben die Immunreaktivität von zellulären Antigenen sowohl bei ungefärbten als auch bei modWS-gefärbten Präparaten optimal erhalten werden. In vielen Studien wurde bereits das Eindeckeln von panoptisch gefärbten Zellproben zur Aufbewahrung genutzt (IWA et al., 1988; CAJULIS et al., 1993; ABENDROTH & DABBS, 1995; NORDGARD et al., 2002; CHENG et al., 2003; KIRBIS et al., 2004; SHTILBANS et al., 2005; BERAKEI et al., 2012). Dieses Eindeckeln bringt allerdings auch einige Nachteile mit sich, wie zum Beispiel einen zusätzlichen Zeitaufwand. Vor der IZC müssen die Proben in Xylol entdeckt werden. In der vorliegenden Studie benötigten die Zellproben, die weniger als 14 Tage eingedeckelt waren, 48 Stunden Aufbewahrung in Xylol bis sich das Deckgläschen löste. Waren die Proben länger eingedeckelt, waren 5 Tage nötig. Weiterhin verstärkte sich durch die lange Immersion in Xylol die Hintergrundfärbung der Präparate (RAMOS-VARA & MILLER, 2014). Damit kann die Erkennbarkeit von IZC-Färbungen vermindert sein. In der vorliegenden Studie wiesen nur die Proben, die mit dem GFAP-Antikörper behandelt worden waren, eine starke Hintergrundfärbung auf. Dafür werden jedoch eher der GFAP-Antikörper oder die fehlende Fixation als das Entdecken in Xylol verantwortlich gemacht (KAWAOI et al., 1982; EUSEBI et al., 1984; STANTA et al., 1988;

HEWITT et al., 2011; RAMOS-VARA & MILLER, 2014).

Die vorliegende Studie weist Limitationen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Eine Limitation ist die fehlende Fixation der Proben auf Alkoholbasis. Alle zytologischen Proben wurden nach Entnahme für kurze Zeit luftgetrocknet. In nahezu allen Studien werden jedoch verschiedene Fixationstechniken auf Alkoholbasis verwendet und empfohlen (KIRBIS et al., 2004). Vor allem zum Nachweis von Virusantigenen hätte die Fixation die Immunreaktivität trotz verschiedener Vorbehandlungen, wie konventioneller Färbung, Eindeckeln und Mikrowellenbehandlung, erhalten können (ADAMS et al., 1984; HEWITT et al., 2011). Daher sollten in zukünftigen Studien die Zellproben in einem Parallelansatz mit einem Fixationsmedium auf Alkoholbasis fixiert werden.

Weiterhin stellt die geringe Probenmenge zur Evaluation der Durchführbarkeit der IZC nach konventioneller zytologischer Färbung bei viralem Antigen eine Limitation dar. Die Resultate geben einen Hinweis darauf, dass virales Antigen gesondert behandelt werden muss und jegliche Vorbehandlungen die Immunreaktivität zerstören. Für eine statistische Auswertung war die Probenmenge zu gering. In zukünftigen Studien sollten die verschiedenen Vorbehandlungen an einer größeren, statistisch auswertbaren Anzahl von Zellproben mit enthaltenem viralem Antigen getestet werden.

Fasst man alle Resultate der vorliegenden Studie zusammen, sollten gefärbte Zellproben mit einem Einbettmedium eingedeckelt werden, falls die Anzahl der Proben limitiert ist und diese mittels zytologischer Diagnostik konventionell gefärbt werden müssen. Das Eindeckeln bewahrt die Immunreaktivität der Proben und ermöglicht eine weitere Diagnostik mittels IZC an denselben Präparaten. Allerdings sollte die IZC mit einer HIAR durch eine Mikrowellenbehandlung erfolgen. Werden virale Antigene vermutet, sollte die IZC an ungefärbten, eingefrorenen oder fixierten Proben durchgeführt werden (ADAMS et al., 1984; SUTHIPINTAWONG et al., 1996; SKOOG & TANI, 2011). In weiteren Studien sollte die IZC an konventionell gefärbten Proben mit viralem Antigen mit verschiedenen Fixationstechniken durchgeführt werden. Dabei sollte getestet werden, ob durch die Fixation die Immunreaktivität auch nach konventioneller zytologischer Färbung, Mikrowellenbehandlung und Eindeckeln der Proben erhalten bleibt und somit das Eindeckeln als alternative Lagerung zum

Tiefgefrieren genutzt werden kann (SUTHIPINTAWONG et al., 1996; SKOOG & TANI, 2011; RAMOS-VARA & MILLER, 2014).

V. EIGENE STUDIE II

Ziel dieser Teilstudie war es, mit der IZC zum Nachweis von FCoV-Antigen einen Test zu entwickeln, welcher in-vivo die Diagnose der FIP erlaubt. Da ZNS-Gewebe schwer zugänglich ist und Biopsien mit erheblichen Risiken verbunden sind, wurde der Liquor als Untersuchungsmedium verwendet. An anderen Körperflüssigkeiten wies die IZC eine Spezifität von 100 % auf. Daher sollte sie nun an Liquorproben von Katzen mit FIP und Katzen mit anderen Erkrankungen evaluiert werden. Dabei wurden jeweils neurologisch auffällige Katzen und Katzen ohne neurologische Symptome eingeschlossen.

Diagnostic utility of cerebrospinal fluid immunocytochemistry for diagnosis of feline infectious peritonitis manifesting in the central nervous system

Stefanie Gründl¹

Kaspar Matiasek², Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Associate Member ECVN

Lara A. Matiasek¹, Dr. med. vet., Dipl. ECVN

Andrea Fischer¹, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVN, Dipl. ACVIM

Sandra Felten¹

Konrad Jurina³, Dr. med. vet., Dipl. ECVN

Katrin Hartmann¹, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

¹ Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Munich, Germany

² Section of Clinical & Comparative Neuropathology, Institute of Veterinary Pathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Munich, Germany

³ Small Animal Centre, Haar, Germany

Journal of Feline Medicine and Surgery, veröffentlicht

Journal of Feline Medicine and Surgery 2017; 19(6): 576-85; doi: 10.1177/1098612X16640839.

Original Article



Diagnostic utility of cerebrospinal fluid immunocytochemistry for diagnosis of feline infectious peritonitis manifesting in the central nervous system

Journal of Feline Medicine and Surgery
1–11

© The Author(s) 2016

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/1098612X16640839

jfms.com

This paper was handled and processed by the European Editorial Office (ESFM) for publication in JFMS



Stefanie Gruendl¹, Kaspar Matiassek², Lara Matiassek¹, Andrea Fischer¹, Sandra Felten¹, Konrad Jurina³ and Katrin Hartmann¹

Abstract

Objectives The aim of the study was to evaluate whether an ante-mortem diagnosis of central nervous system (CNS) feline infectious peritonitis (FIP) is possible via immunocytochemical staining (ICC) of feline coronavirus antigen (FCoV) within macrophages of cerebrospinal fluid (CSF).

Methods Prospectively, CSF samples of 41 cats were investigated, including cats with histopathologically confirmed FIP and neurological signs ($n = 10$), cats with confirmed FIP without CNS involvement ($n = 11$), cats with neurological signs but another confirmed CNS disease ($n = 17$), and cats without neurological signs and a disease other than FIP ($n = 3$). ICC staining of CSF macrophages was performed in all cats. Sensitivity, specificity, positive (PPV) and negative predictive values (NPV) of CSF ICC were calculated.

Results Of 10 samples from cats with CNS FIP, eight had detectable CSF macrophages, seven of which were positive for FCoV. Ten of 11 samples from cats with confirmed FIP without neurological signs had macrophages in the CSF, with all 10 being ICC-positive. In cats with other CNS disorders, 11/17 had macrophages, two of which stained positively. In cats with diseases other than FIP and without neurological disorders, 2/3 revealed macrophages, with one cat showing positive ICC staining. Diagnosis of FIP via CSF ICC had a sensitivity of 85.0% and a specificity of 83.3%. PPV and NPV were 85.0% and 83.3%.

Conclusions and relevance CSF ICC is a highly sensitive test for ante-mortem diagnosis of FIP manifesting in the CNS. However, CNS ICC specificity is too low to confirm FIP and the method should only be applied in conjunction with other features such as CSF cytology. CNS ICC could be helpful to discover pre-neurological stages of CNS FIP.

Accepted: 2 March 2016

Introduction

Feline infectious peritonitis (FIP) is a fatal immune-augmented disease caused by feline coronaviruses (FCoV) that arises from mutation of the generally harmless enteric FCoV.¹ This mutation allows the virus to infect and replicate in macrophages that carry the virus as a Trojan horse into remotely protected areas such as the eye and the central nervous system (CNS).²

The antibody prevalence of FCoV in cats ranges from 20% in single-cat households up to 100% in multi-cat households, but only approximately 5–10% of FCoV-infected cats develop FIP in multi-cat environments.^{3–12} Cats with FIP suffer from abdominal, pleural or pericardial effusion to a greater or lesser degree and/or granulomatous organ changes.⁸

¹Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

²Section of Clinical and Comparative Neuropathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

³Small Animal Referral Centre, Haar, Germany

The results of this study were presented as an abstract at the 20th Eurocongress FECAVA in November 2014 and as an oral presentation at the 23rd annual InnLab (Innere Medizin und Labordiagnostik) conference in January 2015 in Leipzig.

Corresponding author:

Stefanie Gruendl, Clinic of Small Animal Medicine, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität, Veterinärstrasse 13, Munich, 80539 Munich, Germany
Email: stefanie.gruendl@gmx.de

If effusion is present, there are a number of diagnostic options; but, if there is no effusion, confirmation of the diagnosis requires histopathological confirmation of FIP via biopsy or post-mortem examination. In particular, the CNS form of FIP, which most commonly occurs without effusion, remains a post-mortem diagnosis in most cats.¹³ Pyogranulomatous meningoencephalitis and meningo-myelitis lead to neurological signs in about 10% of cats affected by FIP.^{14–16} As the inflammatory lesions are predominantly surface-related, they typically lead to associated cerebrospinal fluid (CSF) changes. These include inflammatory pleocytosis with predominance of neutrophils and macrophages, and a markedly increased protein concentration.^{8,17,18} These findings are, however, not pathognomonic and can occur in a variety of infectious CNS diseases.¹⁹ More specifically, anti-coronavirus IgG can be detected in CSF.^{8,17} However, the presence of antibodies is also not diagnostic.²⁰ In the study of Boettcher et al.,²⁰ there was no significant difference in antibody titres in CSF from cats with neurological signs caused by FIP compared with cats with other neurological diseases.⁸ A recent promising approach was reported to demonstrate a 100% specificity in a prospective case-control study when identifying FCoV in CSF via real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR).²¹ However, the sensitivity of this method was only 42.1% in all cats, and 85.7% in cats with neurological and/or ocular signs. Recently, a case report was published in which FCoV antigen in CSF macrophages was identified via immunocytochemical staining (ICC).²² This new method, however, has not been evaluated in controlled clinical trials.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the diagnostic accuracy of ICC in a larger number of cats, including animals affected by CNS FIP and FIP without neurological signs, and those suffering from other diseases with and without neurological involvement.

Materials and methods

Patients

This study was designed as a prospective case-control study including 41 cats. Cats were divided into four groups: (1) cats with histologically confirmed CNS FIP ($n = 10$); (2) cats with FIP without CNS involvement ($n = 11$); (3) cats with neurological disorders caused by diseases other than FIP (CNS non-FIP, $n = 17$); (4) cats with diseases other than FIP without neurological signs (non-CNS non-FIP, $n = 3$). Cats had to fulfil the inclusion criteria shown in Table 1.

FIP diagnosis in cats with CNS FIP and cats with FIP without CNS involvement ($n = 21$) was confirmed post mortem by histology, based on characteristic pyogranulomatous lesions,^{2,23} with immunohistochemistry (IHC) detecting intralesional evidence of macrophages positive for FCoV in affected organs,^{18,20,24,25} and exclusion

of other pathogens on special stains (Table 1). In all cats with CNS FIP, immunohistochemically positive macrophages were detected within the CNS and, if affected, in other organs (Table 1). In cats with FIP without CNS involvement, immunopositive staining was demonstrated in at least one non-CNS organ (Table 1). Animals of the non-FIP groups ($n = 20$) had a survival time after onset of clinical signs of >1.5 years ($n = 9$),^{8,26,27} or were euthanased and necropsied and did not show positive IHC staining for FCoV antigen in macrophages in any organs ($n = 11$) (Table 1).

CSF of neurological patients was collected for diagnostic reasons independent of the purpose of this study. The material was harvested by tapping of the cerebellomedullary cistern. In all other cats CSF was collected post mortem immediately upon euthanasia by either cisternal tap or transpalpial puncture of the lateral ventricles.

Immunocytochemistry

Collected CSF was cytospun onto uncoated glass slides (R Langenbrinck) immediately after collection using a cytocentrifuge (Hettich Zentrifugen, Universal 16R) according to standard protocols and stored at -20°C (-4°F) until further processing.^{28,29}

ICC was carried out manually using mouse monoclonal anti-coronavirus antibody (clone FIPV3-70; LINARIS GmbH), an avidin-biotin complex detection kit (Vectastain; Vector Laboratory) and diaminobenzidine-tetrahydrochloride as chromagen. The staining protocol was based on standard guidelines for immunocytochemistry (ICC).^{30,31} In short, endogenous peroxidase activity was blocked by treatment with 0.7% H_2O_2 . The slides were then incubated with normal goat serum (dilution 1:20; MP Biomedicals) for 30 mins at room temperature after which they were coated with primary antibody (dilution 1:400) for 17 h at 4°C in a humid chamber, followed by labelling with biotinylated goat anti-mouse IgG (no. E 0433, dilution 1:200; DakoCytomation) and diaminobenzidine reaction. After immunolabelling, the slides were counterstained with Mayer's Haemalaun (AppliChem) and cover slips applied using a xylene-based mounting medium (Histokitt; Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG).

For each specimen undergoing ICC, the presence and yield of immunopositive macrophages were assessed. Macrophages were assessed by scanning of the entire cytospin area, comprising 27 high-power fields at a magnification of at least $\times 400$ (Axiophot; Zeiss). Macrophage counts exceeding >1 macrophage per three fields of vision at $\times 200$ magnification were chosen as a cut-off for high cell yield.

Cytology

For microscopic evaluation of extracellular material, additional slides were stained with haematoxylin and eosin. CSF slides were evaluated by two independent raters blinded to the origin of the sample. Cytostained

Table 1 Inclusion criteria

Cat	Signs/reasons for inclusion	Diagnosis	Confirmation	Confirmation via positive IHC of affected organs	Neurological signs	ICC result
Group 1: cats with CNS FIP						
1	Neurological signs	FIP	Post mortem	CNS, kidney, spleen, liver, pancreas, omentum, lymph nodes, lung	Ataxia, neurological deficits	Negative
2	Neurological signs	FIP	Post mortem	CNS, eyes	Ataxia, uncontrolled moving, vestibular signs	Negative
3	Neurological signs	FIP	Post mortem	CNS, kidney, liver, pancreas, lymph nodes, lung	Ataxia	Positive
4	Neurological signs	FIP	Post mortem	CNS/hypophysis, heart, lung	Ataxia, neurological deficits	Positive
5	Neurological signs, fever	FIP	Post mortem	CNS, kidney, liver, lymph nodes, eyes, lung	Head tremor	Positive
6	Neurological signs	FIP	Post mortem	CNS, thyroid gland, diaphragm, stomach, spleen, perimetrium, lymph nodes, liver, kidney, intestine	Ataxia, tremor	Positive
7	Neurological signs	FIP	Post mortem	CNS, kidney, liver, heart	Paraparesis	Positive
8	Neurological signs, hydrocephalus	FIP	Post mortem	CNS, heart, kidney, eyes	Tetraparesis	Positive
9	Neurological signs	FIP	Post mortem	CNS, liver, lung, lymph nodes, peritoneum	Paresis	Negative
10	Neurological signs	FIP	Post mortem	CNS, kidney, liver, lymph nodes	Tremor, ataxia, vestibular signs	Positive
Group 2: cats with FIP without CNS involvement						
1	Fever, ascites, icterus	FIP	Post mortem	Whole serosa except the kidneys	–	Positive
2	Fever, ascites	FIP	Post mortem	Kidneys, peritoneum	–	Positive
3	Fever, ascites	FIP	Post mortem	Lung, heart, lymph nodes, liver, spleen, intestine, omentum	–	Positive
4	Fever, thoracic effusion, icterus	FIP	Post mortem	Adrenal gland, pancreas, mesenterium, lymph nodes, spleen, liver, lung	–	Positive
5	Fever, ascites, thoracic effusion	FIP	Post mortem	Kidneys, lung, intestine	–	Positive
6	Fever, ascites, icterus	FIP	Post mortem	Spleen, liver, mesenterium, intestine, peritoneum	–	Positive
7	Fever, ascites, icterus	FIP	Post mortem	Liver, spleen, mesenterium, peritoneum, lymph nodes	–	Positive
8	Fever, icterus, ascites	FIP	Post mortem	Intestine, mesenterium, liver, spleen	–	Positive
9	Fever, ascites, icterus	FIP	Post mortem	Spleen, liver, lymph nodes, pancreas	–	Positive
10	Fever, thoracic effusion	FIP	Post mortem	Intestine, liver, spleen, lymph nodes	–	Negative
11	Fever, icterus, ascites, thoracic effusion	FIP	Post mortem	Liver, spleen, mesenterium, lymph nodes	–	Positive

(continued)

Table 1 (continued)

Cat	Signs/reasons for inclusion	Diagnosis	Confirmation and basis for FIP exclusion	IHC result of all organs	Neurological signs	ICC result
Group 3: Cats with neurological diseases other than FIP						
1	Neurological signs	Globoid cell-leukodystrophy	Post mortem, histopathology	Negative in CNS, eyes, kidneys, liver, spleen, lymph nodes, intestine, lungs, heart	Ataxia, paraparesis	Negative
2	Neurological signs	Suspicion of trauma	Ante-mortem, survival > 1.5 years	NP	Ataxia of the hindlimbs	Negative
3	Neurological signs	Lymphocytic meningoencephalitis	Post mortem, histopathology	Negative in CNS, eyes, kidneys, liver, spleen, lymph nodes, intestine, lungs, heart, pancreas, thyroid gland, parathyroid gland, adrenal gland	Seizures	Positive
4	Neurological signs	Idiopathic epilepsy	Ante-mortem, survival > 1.5 years	NP	Seizures	Negative
5	Neurological signs	Idiopathic epilepsy	Ante-mortem, survival > 1.5 years	NP	Falling over, ataxia, blindness, positional nystagmus	Negative
6	Neurological signs	Suspicion of lysosomal storage disease vs resorptive lesion, split cord syndrome	Ante-mortem, survival > 1.5 years	NP	Acute change of personality, neurological deficits	Negative
7	Neurological signs	Intracranial neoplasia	Post mortem, histopathology	Negative in CNS, eyes, kidneys, liver, spleen, lymph nodes, intestine, stomach, lungs, heart	uncoordinated movements, moving with forelimbs not possible at the end	Negative
8	Neurological signs	Intracranial neoplasia	Post mortem, histopathology	Negative in CNS, eyes, kidneys, liver, spleen, lymph nodes, intestine, stomach, lungs, heart, thyroid gland	Seizures	Negative
9	Neurological signs	Hypertensive angiodopathy, brain haemorrhage	Post mortem, histopathology	Negative in CNS, eyes, kidneys, liver, spleen, lymph nodes, peritoneum, intestine, stomach, lungs, heart, thyroid gland, pancreas	Trembling, weakness, neurological deficits	Positive
10	Neurological signs	Squamous cell carcinoma in bulla tympanica with aperture to the brain	Post mortem, histopathology	Negative in CNS, eyes, kidneys, liver, spleen, lymph nodes, peritoneum, intestine, stomach, lungs, heart, bladder	Change of personality, nystagmus, seizures	Negative
11	Neurological signs	Multifocal calcification of vessels within the brain	Post mortem, histopathology	Negative in CNS, eyes, kidneys, liver, spleen, lymph nodes, peritoneum, intestine, stomach, lungs, heart, pancreas	Seizures, disorientation	Negative

(continued)

Table 1 (continued)

Cat	Signs/reasons for inclusion	Diagnosis	Confirmation and basis for FIP exclusion	IHC result of all organs	Neurological signs	ICC result
12	Neurological signs	Renal lymphoma with metastasis in the brain	Post mortem, histopathology	Negative in CNS, eyes, kidneys, liver, spleen, lymph nodes, peritoneum, intestine, stomach, lungs, heart, pancreas, bladder	Seizures	Negative
13	Neurological signs	Suspicion of trauma	Ante mortem, survival > 1.5 years	NP	Paraparesis	Negative
14	Neurological signs	Idiopathic epilepsy	Ante mortem, survival > 1.5 years	NP	Seizures, peripheral vestibular signs	Negative
15	Neurological signs	Idiopathic epilepsy	Ante mortem, survival > 1.5 years	NP	Seizures	Negative
16	Neurological signs	Idiopathic epilepsy	Ante mortem, survival > 1.5 years	NP	Seizures	Negative
17	Neurological signs	Suspicion of trauma vs storage disease	Ante mortem, survival > 1.5 years	NP	Bilateral vestibular syndrome, cerebellum involvement	Negative
Group 4: cats with diseases other than FIP and no neurological signs						
1	Thoracic effusion	Adenocarcinoma lung	Post mortem, histopathology	Negative in CNS, eyes, kidneys, liver, spleen, lymph nodes, intestine, stomach, lungs, pleura, heart	-	Negative
2	Ascites	Enterolymphoma	Post mortem, histopathology	Negative in CNS, eyes, kidneys, liver, spleen, lymph nodes, intestine, stomach, lungs, pancreas, bladder	-	Negative
3	Thoracic effusion	Mediastinal lymphoma	Post mortem, histopathology	Negative in CNS, eyes, kidneys, liver, spleen, lymph nodes, peritoneum, intestine, stomach, oesophagus, trachea, lungs, heart	-	Positive

IHC = immunohistochemistry, ICC = immunocytochemistry, CNS = central nervous system; FIP = feline infectious peritonitis; NP = not performed

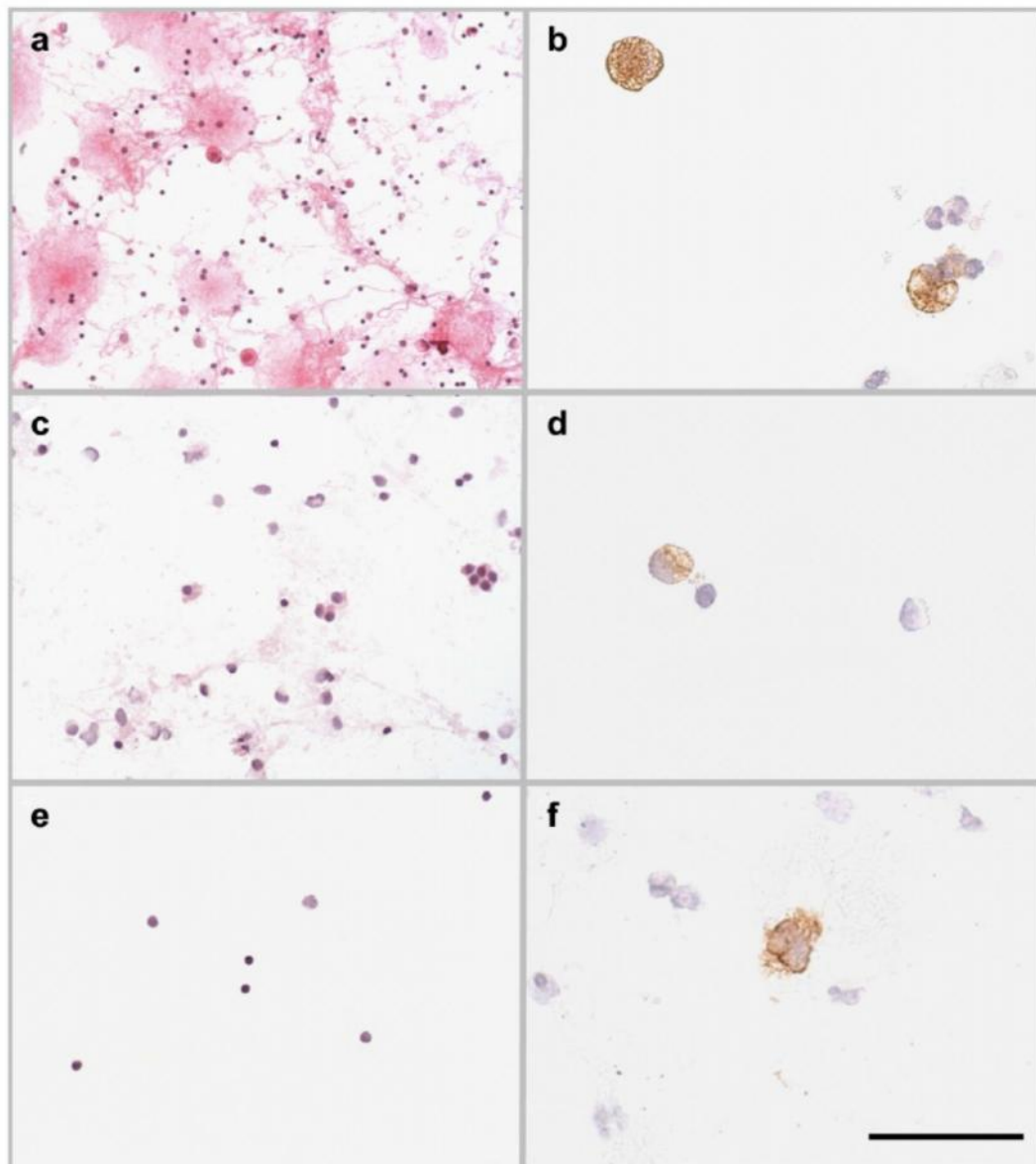


Figure 1 Cytological and immunocytochemical results. (a,c,e) Photomicrographs of slides indicative of feline infectious peritonitis (FIP) (a), compatible with FIP (c) and not indicative of FIP (e). (b,d,f) Immunopositive cerebrospinal fluid macrophages in confirmed central nervous system (CNS) FIP (b,d) and in a cat suffering from mediastinal lymphoma without CNS involvement (f). Note that the staining intensity in the non-CNS non-FIP cat (f) is similar to that of lower level expression in CNS FIP (d). Scale bars = 200 μ m (a), 100 μ m (c,e) and 50 μ m (b,d,f)

slides were assessed for cellular content, composition and preservation, including evidence of bleeding, inflammation, microorganisms and brain tissue aspiration. Depending on the pattern of pleocytosis and protein content, the CSF was categorised as follows: (1) indicative of FIP if pyogranulomatous with macrophageal engulfment

of neutrophils and absence of microorganisms and giant cells; (2) compatible with FIP in case of featuring mixed white blood cell population, including macrophages; and (3) not indicative of FIP owing to the lack of pleocytosis or showing other cellular composition such as exclusively neutrophilic cells (Figure 1).

Statistical evaluation

The sensitivity and specificity, as well as the positive (PPV) and negative predictive values (NPV) were calculated for the whole group, as well as only for cats with neurological signs. Ninety-five percent confidence intervals were determined. Data analyses were performed using a two-sided Fisher's exact test with GraphPad Prism Version 5.0.

Results

CSF cytology

In the group of cats with CNS FIP, 9/10 CSF samples showed a significant pleocytosis. Eight of these nine cases were cytologically classified as indicative for FIP with pyogranulomatous inflammatory changes (Figure 1a). The sample of one cat did not contain cells. There was a mild blood content in two samples and a variable fibrin content in three samples (Table 2).

Ten of 11 samples of the cats with FIP without CNS involvement showed microscopic CSF abnormalities with the majority (9/11) featuring inflammatory changes. FIP-typical pyogranulomatous reactions were seen in 4/11. A mild blood content was present in three samples and in two samples there was a mild or high fibrin content (Table 2).

In the cats with other diseases and neurological signs, 11/17 samples showed inflammatory pleocytosis, 5/11 were unremarkable and 1/11 samples did not contain cells. One sample with elevated cell counts was considered indicative of FIP. In one sample, taken via cisternal tapping, glioneuronal cells were observed. A mild-to-moderate blood content was seen in three samples and in four samples a mild-to-moderate fibrin content was visible (Table 2).

In the non-CNS non-FIP group, 2/3 samples had an abnormal CSF, while the third sample did not contain cells. The two abnormal slides showed inflammatory changes. One sample obtained via ventricle puncture contained glioneuronal cells. There was no blood or fibrin seen microscopically on the slides (Table 2).

ICC

In cats with CNS FIP, 8/10 samples contained macrophages. In seven of these, FCoV antigen was identified immunocytoologically within the cytoplasm of the macrophages (Table 1; Figure 1b,d). In three of these cases, there was a high yield of immunopositive macrophages (Tables 3 and 4).

In cats with FIP without CNS involvement, macrophages were detected microscopically in 10/11 CSF samples, all of which stained positive for FCoV antigen (Table 1). The high-to-low yield ratio among these samples was 8:2, which corresponded to the overall high nucleated cellularity (Tables 2–4).

In the cats with other diseases and with neurological signs, macrophages were present in 11 samples. In two of these samples, the macrophages stained positive for FCoV antigen with one showing a high yield (Tables 1, 3 and 4).

In the cats with other diseases and without neurological signs, 2/3 samples showed macrophages with one showing a positive ICC staining with high yield (Tables 1, 3 and 4, Figure 1f).

Discussion

Intra-vitam diagnosis of FIP in cats with neurological signs that lack body cavity effusions has always been a challenge.^{4,8,32} Owing to the meningeal involvement of CNS manifestations of FIP, most efforts have concentrated on CSF analysis in order to establish a valuable diagnostic test.^{18,20–22} Cytological changes, even though effectively narrowing differentials, are non-specific. Moreover, depending on the location of the pyogranulomatous reaction, vascular compromise and concurrent lymphoproliferative changes, the degree and composition of pleocytosis can vary and might not be indicative for FIP or even mimic other diseases like CNS lymphoma.^{24,33}

Hence, the purpose of this study was to evaluate whether an ante-mortem diagnosis of CNS FIP is possible via ICC staining of FCoV antigen within macrophages of the CSF.²¹ It was demonstrated that FIP could be correctly diagnosed via ICC staining of the CSF in 81.0% of the cats with immunohistochemically confirmed FIP. Thus, the ICC of the CSF had a sensitivity of 85.0% and a PPV of 85.0%. Interestingly, the sensitivity of the test was lower in cats with FIP with CNS involvement (77.8%) than in those with FIP without CNS involvement (91.0%) (Table 4). The sensitivity of 77.8% of ICC in cats with CNS FIP was relatively low, when considering that immunopositive macrophages were detected within the CSF in as much as 90.9% of cats with FIP but without histological evidence of CNS involvement. As only three of these cats exhibited very mild blood contamination, this phenomenon cannot be attributed entirely to a spill-over of infected macrophages. Instead, a majority of ICC-positive animals showed inflammatory pleocytosis, of which 4/9 were FIP-indicative. Even though less likely due to the high cellularity of the CSF, the pure presence of infected monocytes and macrophages, accompanied by lymphocytes, can resemble a bystander effect of systemic inflammation.^{34–38} It is more likely that circulating macrophages have been recruited to the CNS owing to local inflammation. This can happen during immune complex deposition, which can occur as an initial step of FIP manifestation of the brain preceding neurological signs. In this study, none of the cats with FIP without CNS involvement had macroscopic or histological lesions in the CNS. Therefore, these cats with FIP without CNS involvement could have been at the beginning of neurological manifestation of the disease, still without clinical signs and pathological lesions.²¹ In a study of Doenges et al,²¹ 2/12 cats with FIP without neurological/ocular signs showed also a positive RT-qPCR result. In one of these cats, the histological examination

Table 2 Microscopic evaluation and immunocytochemistry (ICC) results

ICC result	CNS FIP (n = 10)		FIP without CNS involvement (n = 11)		CNS non-FIP (n = 17)		Non-CNS non-FIP (n = 3)	
	ICC positive (n = 7)	ICC negative (n = 3)	ICC positive (n = 10)	ICC negative (n = 1)	ICC positive (n = 2)	ICC negative (n = 15)	ICC positive (n = 1)	ICC negative (n = 2)
Pleocytosis								
None	0	0	1	1	0	5	0	0
PgP	7	1	4	0	0	1	1	0
LmP	0	1	3	0	1	4	0	1
MP	0	0	1	0	0	1	0	0
MMP	0	0	1	0	0	0	0	0
MLmP	0	0	0	0	0	2	0	0
MLNP	0	0	0	0	1	0	0	0
UP	0	0	0	0	0	1	0	0
No cells visible	0	1	0	0	0	1	0	1
Nucleated cell content								
Low	3	1	2	1	1	12	0	1
High	4	2	8	0	1	3	1	1
Blood content*								
–	5	3	7	1	2	12	1	2
+	2	0	3	0	0	1	0	0
++	0	0	0	0	0	2	0	0
+++	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrin content*								
–	5	2	7	1	1	11	1	2
+	1	0	1	0	0	2	0	0
++	1	1	0	0	1	2	0	0
+++	0	0	1	0	0	0	0	0
Unclear	0	0	1	0	0	0	0	0
Indicative of FIP	7	1	4	0	0	1	1	0
FIP-compatible	0	0	4	0	1	2	0	1
Not indicative of FIP	0	1	2	1	1	11	0	0
Inflammatory	0	1	0	0	1	8	0	0
Non-inflammatory	0	0	2	1	0	3	0	0

* (–) indicates no blood or fibrin content; (+++) indicates highest blood/fibrin content

CNS = central nervous system; FIP = feline infectious peritonitis; PgP = pyogranulomatous pleocytosis; LmP = lymphomonocytic pleocytosis; MP = monocytic pleocytosis; MMP = mixed, predominantly monocytic pleocytosis; MLmP = mixed, predominantly lymphomonocytic pleocytosis; MLNP = mixed lymphoid and neutrophilic pleocytosis; UP = unclear pleocytosis

Table 3 Cell yield of immunocytochemical (ICC)-positive samples

	CNS FIP	FIP without CNS involvement	CNS non-FIP	Non-CNS non-FIP
Positive ICC results	7	10	2	1
High yield	3	8	1	1
Low yield	4	2	1	0

CNS = central nervous system; FIP = feline infectious peritonitis

of the brain revealed inflammatory changes and necrotic lesions within the CNS. The other cat had no gross or histological lesions.²¹ Hence, in these two cats with FIP without neurological/ocular signs, RT-qPCR detected the FCoV within the CSF. Owing to the low sensitivity of

the RT-qPCR (42.1%), the other CSF samples of cats with FIP might have been false negative in this study.²¹ Comparing PCR results vs ICC results regarding FIP diagnosis on a same patient population should be investigated in further studies.

Table 4 Sensitivity and specificity of cerebrospinal fluid immunocytochemistry in cats with feline infectious peritonitis (FIP)

	All cats	Cats with neurological signs	Cats without neurological signs
Sensitivity	85.0 (CI 62.1–96.8)	77.8 (CI 40.0–97.1)	91.0 (CI 58.7–99.8)
Specificity	83.3 (CI 58.6–96.4)	87.5 (CI 61.7–98.5)	50.0 (CI 1.3–98.7)
PPV	85.0 (CI 62.1–96.8)	77.8 (CI 40.0–97.1)	90.1 (CI 58.7–99.8)
NPV	83.3 (CI 58.6–96.4)	87.5 (CI 61.7–98.5)	50.0 (CI 1.3–98.7)
Prevalence of FIP	52.6 (CI 35.8–69.0)	36.0 (CI 18.0–57.5)	85.0 (CI 54.6–90.1)

Data are % (95% confidence interval)

PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value

Unfortunately, specificity (83.3%) and the NPV (83.3%) of ICC were not as high as expected. Three samples (15.0%) of the control groups contained immunopositive macrophages. This finding severely compromises the validity of the ICC. Independent of the presence (two cats) or absence (one cat) of neurological signs and brain changes (two cats), all these false-positive CSF samples showed inflammatory features that were pyogranulomatous, lymphoid and neutrophilic or lymphomonocytic (Tables 1 and 2). Hence, the cytopathological pattern of the one cat with a mediastinal lymphoma and without neurological signs would be compatible with a preliminary stage of FIP. The cytopathological pattern of the other two cats with neurological signs would also be compatible with either a preliminary stage of FIP or, alternatively, with homing of FCoV-infected macrophages to the CNS in the course of other inflammatory CNS disorders. Thus, it is possible in all three cases that the cats actually suffered from early FIP and other diseases simultaneously. However, immunohistochemical investigations of these cats were negative, making this possibility rather unlikely.

Another reason for the false-positive results is that the immunocytological assay cannot distinguish between mutated FCoV (FIPV) and non-virulent FCoV (FECV) that also is able to infect and replicate in macrophages to some extent.³⁹ It has been documented that productive and sustainable virus replication in macrophages only occurs after mutation of FCoV,² while the general ability of non-virulent FCoV (FECV) to infect macrophages is limited and goes with a low staining signal.³⁹ Thus, a positive staining of non-mutated virus within macrophages is unlikely.

Non-specific staining and aberrant antibody binding have to also be considered as reasons for the false-positive staining results. Endogenous peroxidase activity has been effectively quenched by pretreatment with H₂O₂. The chosen monoclonal primary antibody has been used in multiple studies on FIP and is directed at coronavirus nucleocapsids.^{25,26,40} It is known to react with FCoV serotypes 1 and 2, ferret coronavirus, canine coronavirus, transmissible gastroenteritis virus and bovine coronavirus.⁴¹ However, there are no reports on affinity to endogenous epitopes and structures, so that non-specific staining is unlikely but possible.

There are some limitations in the study. First of all, only a low amount of CSF could be collected in most cats with FIP. FIP is a disease affecting mostly young cats, <1 years of age, that usually have a body weight <2 kg. Hence, the amount of CSF that could be collected was <0.5 ml (when following the guidelines to take not more than 1 ml/5 kg⁴²). Accordingly, only a few cells could be gained from the samples. Although CSF was immediately preserved, the instability of CSF cells might be damaged by freezing or washed off during immunolabelling. Thus, often only a few cells were available for interpretation of the ICC, especially in cases with no inflammatory CSF. Another limitation is that FIP could not be excluded for sure in the control cats that could have had FIP beside another underlying disease, although IHC of all organs was negative.

Conclusions

ICC on CSF taps was shown to be a sensitive test for diagnosis of FIP, regardless of whether the CNS was involved or not. Unfortunately, the specificity of the method was not high enough. Immunopositivity of CSF macrophages in cats with neurological signs, but without detectable FIP on post-mortem examination, might precede histological changes of FIP. When summarising the results of this study, ICC of CSF cannot be considered a useful test for confirmation of FIP.

Acknowledgements We are grateful to Mrs Karin Stingl for excellent technical assistance.

Conflict of interest The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- 1 Pedersen NC. **Coronavirus diseases (coronavirus enteritis, feline infectious peritonitis)**. In: Holzworth J (ed). *Diseases of the cat: medicine and surgery*. Philadelphia, PA: WB Saunders Company, 1987, pp 193–214.

- 2 Kipar A and Meli ML. Feline infectious peritonitis: still an enigma? *Vet Pathol* 2014; 51: 505–526.
- 3 Brown MA, Troyer JL, Pecon-Slaterry J, et al. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1445–1452.
- 4 Pedersen NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963–2008. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 225–258.
- 5 Addie DD. Clustering of feline coronaviruses in multicat households. *Vet J* 2000; 159: 8–9.
- 6 Addie DD and Jarrett O. A study of naturally occurring feline coronavirus infections in kittens. *Vet Rec* 1992; 130: 133–137.
- 7 Kennedy M, Citino S, McNabb AH, et al. Detection of feline coronavirus in captive Felidae in the USA. *J Vet Diagn Invest* 2002; 14: 520–522.
- 8 Hartmann K. Feline infectious peritonitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2005; 35: 39–79.
- 9 Pedersen NC. Serologic studies of naturally occurring feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* 1976; 37: 1449–1453.
- 10 Pedersen NC. Feline infectious peritonitis: something old, something new. *Fel Pract* 1976; 6: 42–51.
- 11 Addie D and Jarrett O. Feline coronavirus antibodies in cats. *Vet Res* 1992; 131: 202–203.
- 12 Addie D, Toth S, Murray GD, et al. Risk of feline infectious peritonitis in cats naturally infected with feline coronavirus. *Am J Vet Res* 1995; 56: 429–434.
- 13 Norris JM, Bosward KL, White JD, et al. Clinicopathological findings associated with feline infectious peritonitis in Sydney, Australia: 42 cases (1990–2002). *Aust Vet J* 2005; 83: 666–673.
- 14 Rohrer C, Suter PF and Lutz H. The diagnosis of feline infectious peritonitis (FIP) – retrospective and prospective study. *Kleintierpraxis* 1993; 38: 379–389.
- 15 Kline KL, Joseph RJ and Averill DR. Feline infectious peritonitis with neurological involvement: clinical and pathological findings in 24 cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 1994; 30: 111–118.
- 16 Slauson DO and Finn JP. Meningoencephalitis and panophthalmitis in feline infectious peritonitis. *J Am Vet Med Assoc* 1972; 160: 729–734.
- 17 Foley JE, Lapointe JM, Koblik P, et al. Diagnostic features of clinical neurologic feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med* 1998; 12: 415–423.
- 18 Steinberg TA, Boettcher IC, Matiassek K, et al. Use of albumin quotient and IgG index to differentiate blood- vs brain-derived proteins in the cerebrospinal fluid of cats with feline infectious peritonitis. *Vet Clin Pathol* 2008; 37: 207–216.
- 19 Gunn-Moore DA and Reed N. CNS disease in the cat: current knowledge of infectious causes. *J Feline Med Surg* 2011; 13: 824–836.
- 20 Boettcher IC, Steinberg T, Matiassek K, et al. Use of anti-coronavirus antibody testing of cerebrospinal fluid for diagnosis of feline infectious peritonitis involving the central nervous system in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2007; 230: 199–205.
- 21 Doenges SJ, Weber K, Dorsch R, et al. Detection of feline coronavirus in cerebrospinal fluid for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats with and without neurological signs. *J Feline Med Surg* 2016; 18: 104–109.
- 22 Ives EJ, Vanhaesebrouck AE and Cian F. Immunocytochemical demonstration of feline infectious peritonitis virus within cerebrospinal fluid macrophages. *J Feline Med Surg* 2013; 15: 1149–1153.
- 23 Dahme E and Weiss E. Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 6th ed. Stuttgart: Enke Verlag, 2007.
- 24 Kipar A, Bellmann S, Kremendahl J, et al. Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 65: 243–257.
- 25 Tammer R, Evensen O, Lutz H, et al. Immunohistological demonstration of feline infectious peritonitis virus antigen in paraffin-embedded tissues using feline ascites or murine monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 49: 177–182.
- 26 Pedersen NC. An overview of feline enteric coronavirus and feline infectious peritonitis virus infection. *Fel Pract* 1995; 23: 7–20.
- 27 Robison RL, Holzworth J and Gilmore CE. Naturally occurring feline infectious peritonitis: signs and clinical diagnosis. *J Am Vet Med Assoc* 1971; 158 Suppl 2: 981–986.
- 28 Fry MM, Vernau W, Kass PH, et al. Effects of time, initial composition, and stabilizing agents on the results of canine cerebrospinal fluid analysis. *Vet Clin Pathol* 2006; 35: 72–77.
- 29 Storch-Hagenlocher B, Reiber H, Wildemann B, et al. Liquordiagnostik. In: Wildemann B, Oschmann P and Reiber H (eds). Neurologische Labordiagnostik. 1st ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG, 2006, pp 30–73.
- 30 Ramos-Vara JA and Miller MA. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry – the red, brown, and blue technique. *Vet Pathol* 2014; 51: 42–87.
- 31 Dako, Boenisch T, Taylor CR, et al. Education guide/immunohistochemical (IHC) staining methods. 5th ed. Carpinteria, CA: Dako North America, 2009, p 172.
- 32 Kipar A, Koehler K, Bellmann S, et al. Feline infectious peritonitis presenting as a tumour in the abdominal cavity. *Vet Rec* 1999; 144: 118–122.
- 33 Singh M, Foster DJ, Child G, et al. Inflammatory cerebrospinal fluid analysis in cats: clinical diagnosis and outcome. *J Feline Med Surg* 2005; 7: 77–93.
- 34 Webb AA and Muir GD. The blood–brain barrier and its role in inflammation. *J Vet Intern Med* 2000; 14: 399–411.
- 35 Engelhardt B and Wolburg H. Mini-review: transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol* 2004; 34: 2955–2963.
- 36 Wolburg H, Wolburg-Buchholz K and Engelhardt B. Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta Neuropathol* 2005; 109: 181–190.
- 37 Konsman JP, Drukarch B and Van Dam AM. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci (Lond)* 2007; 112: 1–25.
- 38 Bolton SJ, Anthony DC and Perry VH. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from

- cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience* 1998; 86: 1245–1257.
- 39 Poland AM, Vennema H, Foley JE, et al. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3180–3184.
- 40 Hok K. Demonstration of feline infectious peritonitis virus in conjunctival epithelial cells from cats. A simple and reliable method for clinical veterinary virology screening. *APMIS* 1989; 97: 820–824.
- 41 Linaris. Mouse anti-feline coronavirus monoclonal. <http://www.linaris.de/datenblatt/DBL-E-MAK2194.pdf> (2015, accessed 11 March 2016).
- 42 Dewey CW and Ducoté JM. **Neurodiagnostics**. In: Dewey CW (ed). A practical guide to canine and feline neurology. 2nd ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell, 2008, pp 75–76.

VI. ERWEITERTE DISKUSSION DER STUDIE II

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Liquor-IZC als Nachweisverfahren für die ZNS-Manifestation einer FIP zu evaluieren. Diese wäre insbesondere in den Fällen hilfreich, in denen keine Körperhöhlenergüsse vorhanden sind.

Der Nachweis von FCoV-Antigen in Makrophagen aus Körperhöhlenergussproben mittels Immunfluoreszenz hatte eine Spezifität von 100 % (HIRSCHBERGER et al., 1995). Da eine ZNS-Manifestation der FIP meist ohne Effusionen in Körperhöhlen einhergeht (PARODI et al., 1993; HARTMANN et al., 2003; ADDIE et al., 2009), wurden in dieser Studie II immunzytochemische Analysen zum Nachweis von FCoV-Antigen aus Liquorproben durchgeführt und an einer größeren Katzenpopulation evaluiert. Erste Anhaltspunkte zur diagnostischen Tauglichkeit der Liquor-IZC erbrachten IVES und Mitarbeitern (2013) in einer einzelnen Fallbeschreibung (IVES et al., 2013). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden nun die Anwendbarkeit und die diagnostische Aussagekraft genauer überprüft.

Die Ergebnisse zeigten, dass bei Katzen mit histologisch bestätigter FIP immunzytochemisch FCoV-positive Liquormakrophagen nachweisbar waren. Dies war sowohl bei Katzen mit neurologischer FIP, als auch bei Katzen mit FIP ohne neurologischen Symptomen der Fall.

In der klinischen Patientenaufarbeitung deuten allgemeine Parameter, wie Alter, Herkunft und die klinischen Symptome der Katzen, oft auf eine FIP hin (PEDERSEN, 2014a). Betroffen sind meist Katzen im Alter von 4 bis 36 Monaten, die aus Mehrkatzenhaushalten stammen (ADDIE et al., 2009; PEDERSEN, 2014a). Befunde der klinischen Untersuchung, wie pralles Abdomen oder Dyspnoe aufgrund von Aszites oder pleuralen Körperhöhlenergüssen sowie Massen in Nieren oder anderen Organen, verursacht durch pyogranulomatöse Läsionen oder vergrößerte Lymphknoten, können den Verdacht entstehen lassen (HARTMANN, 2005; ADDIE et al., 2009; PEDERSEN, 2014a). Die klinischen Symptome sind allerdings unspezifisch und resultieren aus Veränderungen erkrankter Organsysteme (HARTMANN, 2005; NORRIS et al., 2005; DIAZ & POMA, 2009; PEDERSEN, 2014a). Blutbildveränderungen und Antikörper-Nachweis sind ebenfalls nicht aussagekräftig. Es können eine Lymphopenie, Neutrophilie,

Anämie, Hyperproteinämie, Hypergammaglobulinämie, ein erniedrigtes Albumin-Globulin-Verhältnis sowie eine erhöhte Aktivität von Leberenzymen und erhöhte Bilirubin- und Nierenwerte vorhanden sein (HARTMANN et al., 2003; NORRIS et al., 2005; SHARIF et al., 2010). Antikörper im Blut sprechen nur für eine aktuelle oder vergangene FCoV-Infektion und nicht für eine FIP (ADDIE & JARRETT, 1992). Der direkte Virusnachweis mittels RT-PCR aus Serumproben lieferte Ergebnisse mit einer hohen Spezifität von 100 %, aber einer sehr niedrigen Sensitivität von 7 % (FELTEN et al., 2017b).

Sind bei Katzen mit FCoV-Infektionen Körperhöhlenergüsse vorhanden, können Antikörper gegen das FCoV auch oft in den Körperhöhlenergüssen nachgewiesen werden. Diese Antikörper korrelieren dabei mit den im Blut vorhandenen Antikörpern (SOMA & ISHII, 2004). Das Vorliegen von Antikörpern in Ergüssen hatte in der Untersuchung von HARTMANN und Mitarbeitern (2003) einen prädiktiven Wert von 90 % und einen negativen prädiktiven Wert von 79 % zur Diagnose der FIP. In den Untersuchungen von KENNEDY und Mitarbeitern (1998) war der Nachweis von Antikörpern aus Ergüssen nicht hilfreich, da alle Katzen Antikörper aufwiesen, unabhängig ob sie FIP hatten oder nicht (KENNEDY et al., 1998). Weiterhin kann zur Diagnostik der FIP die Detektion des FCoV-Antigens in Makrophagen innerhalb des Ergusses mit einer Spezifität von 70-100 % genutzt werden (PARODI et al., 1993; HIRSCHBERGER et al., 1995; HARTMANN et al., 2003; ADDIE et al., 2009; LITSTER et al., 2013). FELTEN und Mitarbeiter (2017) konnten FIP über den Nachweis des FCoV-Antigens in Ergussmakrophagen mittels der IZC detektieren. Die Sensitivität dieser Methode lag bei 85 %, die Spezifität bei 72 % (FELTEN et al., 2017a).

Eine ZNS-Manifestation der FIP geht meist ohne Körperhöhlenergüsse einher und stellt daher eine diagnostische Herausforderung dar (KIPAR et al., 1999; PEDERSEN, 2009; SHARIF et al., 2010). Eine definitive Diagnose der FIP, die sich ausschließlich im ZNS manifestiert, kann bisher nur über eine Sektion mit immunhistochemischer Untersuchung der Läsionen gestellt werden (HARTMANN, 2005; PEDERSEN, 2009; SHARIF et al., 2010; GIORI et al., 2011).

Die Liquoruntersuchung stellt ein gängiges Verfahren zur Diagnostik entzündlicher Erkrankungen des ZNS dar (DEWEY & DUCOTÉ, 2008; REIBER, 2016). Bei nahezu allen neurologisch auffälligen Patienten wird daher eine zytologische

Untersuchung des Liquors mit häufig zusätzlicher Bestimmung von Antikörpern (IgG, IgM und IgA) und dem Nachweis von DNA oder RNA angestrebt (STORCH-HAGENLOCHER et al., 2006; REIBER, 2016). Der Liquor wurde in verschiedenen Studien auch als Untersuchungsmedium zum Nachweis der ZNS-Manifestation der FIP genutzt. Der Liquor kann bei Katzen mit FIP einen erhöhten Proteingehalt und eine hohe Zellzahl mit vorwiegend neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen beinhalten (FOLEY et al., 1998; DIAZ & POMA, 2009). Eine Studie untersuchte den Liquor auf Antikörper gegen das FCoV. Antikörper im Liquor konnten aber nur bei denjenigen Katzen nachgewiesen werden, die auch im Blut hohe Antikörpertiter aufwiesen. Daher ging man davon aus, dass die Antikörper im Liquor aus dem Blut stammten (BOETTCHER et al., 2007). Mittels der RT-PCR kann FCoV-RNA in Liquorproben nachgewiesen werden. Während die RT-PCR in Vollblut auch falsch positiv sein kann (EGBERINK et al., 1995; HERREWEGH et al., 1995a; GUNN-MOORE et al., 1998; HARTMANN et al., 2003; CAN-SAHNA et al., 2007; KIPAR et al., 2010), scheint die RT-PCR aus Liquor sehr spezifisch zu sein (100 %). Bei Patienten mit neurologischer und/oder okulärer FIP-Symptomatik wies sie zudem eine relativ hohe Sensitivität von 86 %, im Vergleich zu nicht neurologisch auffälligen Katzen mit FIP (42 %), auf (DOENGES et al., 2016).

In der vorliegenden Studie wurde bei 21 von 41 Katzen FIP immunhistochemisch nachgewiesen, wobei 10 davon eine ZNS-Manifestation aufwiesen. Die IZC der Liquorproben aller Katzen wurde an ungefärbten und bei – 20 °C eingefrorenen Liquorproben durchgeführt. Eine positive immunzytochemische Reaktion von Liquormakrophagen wurde insgesamt bei 17 von 21 Katzen detektiert. Demnach konnte mit dieser Methode FIP bei 81 % der Katzen richtig diagnostiziert werden. Die Sensitivität der IZC bei der Untersuchung von Liquormakrophagen als Nachweismethode für FIP betrug insgesamt 85 %, war aber bei Katzen mit ZNS-Manifestation der FIP mit 78 % niedriger als bei Katzen mit FIP ohne ZNS-Manifestation (90 %). Bei 91 % der Katzen mit FIP ohne ZNS-Manifestation konnten immunzytologisch FCoV-Antigen-positive Makrophagen im Liquor nachgewiesen werden.

Warum Virusantigen im Liquor bei den Katzen ohne ZNS-Manifestation der FIP häufiger detektiert wurde als bei Katzen mit einer ZNS-Manifestation der Erkrankung bedarf weiteren Untersuchungen. Da in der vorliegenden Studie 3 von

11 Katzen mit FIP ohne ZNS-Manifestation eine geringe Blutkontamination im Liquor aufwiesen, war eine Fehldetektion durch eine entnahmebedingte Einblutung in den Liquor vernachlässigbar. Der Liquor gesunder Katzen hat eine physiologische Zellzahl von weniger als 5 Zellen/ μ l. Monozyten kommen dabei im gesunden Liquor in einem prozentualen Anteil von 30 % vor. Makrophagen sollten ohne pathologischen Hintergrund allerdings nicht anzutreffen sein (DEWEY et al., 2008).

Bei den Katzen mit FIP ohne ZNS-Manifestation bestand histologisch kein Hinweis auf eine anderweitige ZNS-Erkrankung bei vollständiger Untersuchung des Gehirns. In der Abklatschzytologie wurden zwar vereinzelt Veränderungen festgestellt, die histologisch nicht nachweisbar waren, die Rate der rein zytologisch positiven Befunde bei den Katzen dieser Studie macht eine mangelnde Sensitivität der Histologie allerdings unwahrscheinlich (WUENSCHKE et al., 2016). Da radikulospinale Beeinträchtigungen wesentlich schlechter kompensiert werden als die des Gehirns, dürfte bei dieser Patientenkohorte die Liquorzytologie auch eher nicht eine subklinische FIP von Rückenmark und Nervenwurzeln widerspiegeln. Dieser Ausschluss erhärtet sich insbesondere auch durch das Fehlen anderer Entzündungszeichen innerhalb der Liquorproben, vor allem von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und Fibrin. Man könnte also eine bislang unbekannt weite Zirkulation infizierter, aber nicht-enzephalitogener Makrophagen oder das Initialstadium der ZNS-Manifestation postulieren sowie die Möglichkeit einer falsch-positiven Immunfärbung erwägen.

Eine Aktivierung von Makrophagen im ZNS kann die Folge von Immunkomplexablagerungen sein (BOLTON et al., 1998; KIPAR et al., 1998; ENGELHARDT & WOLBURG, 2004; KIPAR et al., 2005; WOLBURG et al., 2005; KONSCHAN et al., 2007). Die Komplement- und Fc-Rezeptor-Aktivierung erhöhen die Phagozytoseaktivität von Makrophagen und verursachen somit die weitere Aufnahme von FCoV (JACOBSE-GEELS, 1982; PEDERSEN, 1995; KIPAR et al., 2005). Diese Immunkomplexablagerungen werden gerade am Anfang einer FIP beobachtet (KIPAR et al., 1998; KIPAR et al., 2005). Weiterhin können die Makrophagen aufgrund einer Vaskulitis in das ZNS und den Liquor gelangt sein (PEDERSEN, 1976b; HARTMANN, 2005; BOETTCHER et al., 2007; ADDIE et al., 2009). Diese Vaskulitis wird durch eine initiale Makrophageninfiltration verursacht, gefolgt von einer Ablagerung von

Immunkomplexen und Komplementfaktoren, das in einer pyogranulomatösen Entzündung endet (KIPAR et al., 1998; KIPAR et al., 2005). Zusätzlich wird die Blut-Hirn-Schranke zerstört, wodurch Veränderungen des Liquorflusses und -drucks entstehen und die eine Einwanderung von Entzündungszellen zur Folge hat. Antikörper können in diesem Zuge ebenfalls in den Liquor übertreten (KLINE et al., 1994; BOETTCHER et al., 2007). Es scheint auch eine gewisse Antikörperproduktion innerhalb des ZNS stattzufinden. FOLEY und Mitarbeiter (1998) untersuchten die FCoV-Antikörperkonzentrationen bei Katzen mit FIP und fanden heraus, dass die Konzentrationen im Liquor höher waren, als die im Serum der jeweiligen Katze (FOLEY et al., 1998). Aus diesem Grund wurde angenommen, dass Antikörper im ZNS-Gewebe als Folge der FCoV-Replikation produziert wurden (FOLEY et al., 1998; FOLEY & LEUTENEGGER, 2001; BOETTCHER et al., 2007; STEINBERG et al., 2008). Bei Menschen findet laut Studien bei infektiösen ZNS-Erkrankungen, wie bei der humanen Herpesvirusinfektion, eine Antikörperproduktion gegen das infektiöse Agens im ZNS statt (CHAPMAN et al., 2005; DERFUSS et al., 2005). Makrophagen können dabei über offene Schlussleisten (tight junctions) zwischen den Endothelzellen oder über Diapedese durch die Endothelzellen in das ZNS eintreten (BOLTON et al., 1998; ENGELHARDT & WOLBURG, 2004; WOLBURG et al., 2005; KONSMAN et al., 2007).

In einer anderen Kohorte konnte auch mittels RT-PCR FCoV im Liquor nicht-neurologischer FIP-Katzen detektiert werden (DOENGES et al., 2016). In dieser Studie wurde der Liquor von 19 Katzen mit immunhistochemisch nachgewiesener FIP untersucht. Von den 19 Katzen zeigten 7 neurologische und/oder okuläre Symptome. Eine FIP ohne ZNS-Manifestation wiesen 12 von 19 Katzen auf. Mittels RT-PCR von Liquorproben konnte bei 8 Katzen mit einer ZNS-Manifestation der FIP, aber auch bei 2 Katzen mit FIP ohne ZNS-Manifestation die Erkrankung FIP bestätigt werden. Nur bei einer dieser 2 Katzen wurde bei der mikroskopischen post-mortem-Untersuchung eine histologische Veränderung im ZNS im Sinne einer FIP festgestellt (DOENGES et al., 2016). Aufgrund der niedrigen Sensitivität der RT-PCR von 42 % ist anzunehmen, dass diese Methode das FCoV nicht bei allen Patienten mit ZNS-Manifestation der FIP detektierte. Um dieses Phänomen, dass in der vorliegenden Studie bei Katzen mit einer FIP ohne ZNS-Manifestation häufiger FCoV im Liquor nachgewiesen werden konnten,

obwohl im ZNS keine Läsionen zu sehen waren, als bei Katzen mit Läsionen im ZNS, besser einschätzen zu können, sollte in zukünftigen Studien die IZC mit der RT-PCR oder besser mit einer In-situ-Hybridisierung kombiniert und die Ergebnisse verglichen werden.

Die Spezifität von 83 % war in der vorliegenden Studie niedriger als ursprünglich erwartet. Bei 3 Katzen, bei denen FIP immunhistochemisch nicht bestätigt werden konnte, wurden im Liquor immunzytochemisch FCoV-Antigen-positive Makrophagen nachgewiesen. Zwei der Katzen wiesen neurologische Veränderungen in Abwesenheit von Entzündungen auf. In der Untersuchung von HIRSCHBERGER und Mitarbeitern (1995) konnte mittels Immunfluoreszenzverfahren bei 34 von 49 Katzen, bei denen FIP histopathologisch bestätigt worden war, FCoV-Antigen in Makrophagen von Körperhöhlenergüssen nachgewiesen werden. Die Sensitivität dieser Methode betrug 84 %, die Spezifität 100 % (HIRSCHBERGER et al., 1995). Positive Ergebnisse bestätigten somit eine FIP-Erkrankung. Im Gegensatz dazu war in der Studie von FELTEN und Mitarbeitern (2017) die Spezifität des immunzytochemischen Nachweises von FCoV-Antigen in Erguss-Makrophagen mit 72 % niedriger (FELTEN et al., 2017a). In einer weiteren Studie wurden mit der Immunfluoreszenz ebenfalls falsch positive Resultate in 2 von 17 Fällen beschrieben (Spezifität 71 %) (LITSTER et al., 2013).

Warum diese als falsch positiv eingestuft Ergebnisse auftraten, ist derzeit noch unbekannt. Eine Möglichkeit ist, dass diese Katzen zwar an einer bestimmten Erkrankung litten und deswegen euthanasiert wurden, sie aber dennoch auch an FIP erkrankt waren, die bisher aber ohne Organmanifestation einherging und daher immunhistochemisch noch nicht nachgewiesen werden konnte. Die genaue Inkubationszeit von FIP ist bisher unbekannt. Ebenso weiß man nicht, ab welchem Zeitpunkt Organläsionen zu sehen sind (LITSTER et al., 2013).

Histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen gelten als Goldstandard zur post-mortem-Bestätigung der FIP durch Nachweis des FCoV-Antigens in verändertem Gewebe (HARTMANN, 2005; ADDIE et al., 2009; KIPAR & MELI, 2014). Positive Ergebnisse bestätigen eine FIP. Allerdings konnte mittels IHC in der Studie von TAMMER und Mitarbeitern (1995) nur bei 97 % der an FIP erkrankten Katzen das FCoV-Antigen in Gewebsmakrophagen dargestellt werden (TAMMER et al., 1995). Daher könnten Organläsionen, die in der IZC

positiv für das FCoV-Antigen waren, mittels IHC verpasst worden sein, obwohl bei allen vorhandenen Organen die IHC durchgeführt wurde. Eine weitere Erklärung ist, dass der Primärantikörper nicht zwischen dem mutierten FCoV und dem nicht virulenten FCoV unterscheiden kann. Auch das FECV kann in Makrophagen replizieren (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998; FELTEN et al., 2017a). Daher kann die positive Farbreaktion durch das harmlose FECV verursacht worden sein. Allerdings tritt eine massive und beständige Replikation in Makrophagen, die immunzytochemisch detektiert werden kann, nur bei FIP auf (HARTMANN, 2005; KIPAR & MELI, 2014). Dies lässt die Möglichkeit einer positiven immunzytochemischen Farbreaktion durch FECV unwahrscheinlich erscheinen. Eine Kombination der IZC mit einer RT-PCR oder In-situ-Hybridisierung wäre geeignet, dieses Phänomen genauer zu untersuchen. Weiterhin muss bedacht werden, dass der monoklonale Antikörper FIPV3-70 mit anderen bisher unbekannten Antigenen zu Kreuzreaktionen geführt und somit falsch positive Ergebnisse geliefert haben könnte (LITSTER et al., 2013). Es ist bekannt, dass das FIPV3-70 auch mit dem FCoV-Typ-I und -Typ-II, dem FrCoV und auch dem CCoV und dem TGEV des Schweines reagiert (LINARIS, 2015). Es gibt jedoch keine Hinweise, dass dieser Antikörper an endogene Epitope oder Strukturen bindet. Dies macht die Möglichkeit der unspezifischen Farbreaktion unwahrscheinlich.

Eine Limitation der Studie ist darin zu sehen, dass die Katzen der Vergleichsgruppen ohne nachgewiesene FIP zwar aufgrund einer bestimmten anderen Grunderkrankung euthanasiert wurden, dennoch aber zusätzlich an FIP erkrankt gewesen sein könnten. Bisher gibt es keine Methode, FIP grundsätzlich auszuschließen.

Eine weitere Limitation stellte die geringe Menge an verfügbarem Liquor dar. Es sollte nicht mehr Liquor als 1 ml/5 kg Körpergewicht entnommen werden, um bei dem Patienten keine Nebenwirkungen hervorzurufen (DEWEY & DUCOTÉ, 2008). FIP tritt in der Regel bei sehr jungen Katzen mit einem Körpergewicht von weniger als 2 kg auf. Daher lag die Menge an Liquor, die bei diesen Patienten entnommen werden konnte, im Bereich von weniger als 0,5 ml. Außerdem besitzt der eiweißreiche Liquor aufgrund seiner hohen Viskosität eine nur geringe Fließgeschwindigkeit durch die Liquorpunktionskanüle. Dementsprechend stehen

oft nur wenige Zellen für die IZC zur Verfügung. Zudem ist die IZC ein Verfahren, das leicht zu Zellverlusten führt. Häufiges Waschen und die Behandlung mit Wasserstoffperoxid kann zur zusätzlichen Verringerung der Zellzahl auf den Objektträgern führen. Das Baden der Liquorproben in Wasserstoffperoxid blockt die endogene Peroxidase der Zellen und verringert somit die unspezifische Hintergrundfärbung. Makroskopisch sieht man dabei die Entstehung von Luftblasen, die zur Oberfläche aufsteigen. Dabei können Zellen vom Objektträger abgelöst werden. In der vorliegenden Studie waren bei 3 Proben keine Zellen mehr sichtbar.

Zusammenfassend sprechen die ausgewerteten Daten dafür, dass die immunzytochemische Untersuchung des Liquors auf FCoV-Antigen-positive Makrophagen einen sensitiven Test zur Diagnose einer FIP bei vorhandener und fehlender ZNS-Manifestation darstellt. Die Spezifität dieses Tests ist jedoch nicht ausreichend gut. Positive Befunde sollten nur in Kombination mit Signalement, klinischer Untersuchung und Laborbefunden interpretiert werden. Da bei Katzen mit FIP ohne ZNS-Manifestation sowohl in der RT-PCR als auch in der IZC von Liquorproben positive Ergebnisse zu sehen waren, sollten in weiteren Studien beide Methoden in Kombination evaluiert und die Ergebnisse verglichen werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

In der Studie I wurde das Verfahren der Immunzytochemie (IZC) an Zellproben, die zuvor einer konventionellen Färbung unterzogen worden waren, untersucht. In derselben Versuchsdurchführung wurde evaluiert, durch welche Vorbehandlung die Immunreaktivität der Zellen für die IZC am besten erhalten bleibt. Hierfür wurden 186 Lymphknotenfeinnadelaspirations- und Gehirnakklatschzellproben mit zellulärem Antigen und 22 Ergussproben mit FCoV-Antigen verwendet. Verschiedene Vorbehandlungsverfahren beinhalteten die konventionelle Färbung mit und ohne Eindeckeln der Zellproben, das Eindeckeln an sich ohne vorheriger Färbung und die Mikrowellenbehandlung. Nur durch das Eindeckeln konnte die Immunreaktivität von zellulären Antigenen nach konventioneller Färbung für die IZC erhalten werden. Eine Mikrowellenbehandlung zur Antigendemaskierung vor dem immunzytochemischen Verfahren optimierte die Resultate. Ist allerdings nicht eindeutig sicher, ob eine Viruserkrankung vorliegt, sollten die Proben ungefärbt bleiben, da nachgewiesen werden konnte, dass jegliche Vorbehandlung die Immunreaktivität des FCoV-Antigens zerstörte.

In der Studie II wurde die IZC zum Nachweis des Antigens des felines Coronavirus (FCoV) in Makrophagen aus Liquorproben eingesetzt. Dazu wurde der Liquor von 41 Katzen immunzytochemisch auf das Antigen des FCoV untersucht. Bei 21 von 41 Katzen wurde FIP immunhistochemisch in veränderten Organproben nachgewiesen. Bei 10 von 21 Katzen mit neurologischen Symptomen konnte post mortem eine ZNS-Manifestation der FIP mit pyogranulomatösen Läsionen dargestellt werden. Bei 20 von 41 Katzen wurde FIP durch Sektion und immunhistochemische Färbung aller Organe nicht nachgewiesen oder wurde aufgrund einer Überlebenszeit der Katzen von mehr als 1,5 Jahren ausgeschlossen. Von diesen 20 Kontrollkatzen wiesen 17 Katzen neurologische Symptome auf. Die Liquorproben wurden auf Art der Pleozytose und das Vorhandensein einer FIP-typischen Zellpopulation, Fibringehalt, Blutkontamination und immunzytochemisch positive Makrophagen hin untersucht. Mit der IZC von Liquormakrophagen konnte FIP bei 81,0 % der Katzen korrekt nachgewiesen werden. Die Sensitivität der IZC aus Liquor betrug insgesamt 85,0 % und war bei Katzen mit FIP ohne ZNS-Beteiligung mit 90,1 % höher als bei Katzen, bei denen sich FIP innerhalb des ZNS manifestierte (77,8 %). Die Spezifität war mit 83,3 %

niedriger als aufgrund vorliegender Studien zu erwarten gewesen wäre. Negative Ergebnisse in der IZC von Liquorproben schließen FIP nicht aus. Positive Befunde dürfen nur mit Vorsicht und in Kombination mit Signalement, klinischen Symptomen und Laborveränderungen beurteilt werden, da falsch positive Ergebnisse auftreten können.

VIII. SUMMARY

Implementation of the immunocytochemistry (ICC) of panoptically stained samples was evaluated in study I. In order to analyze which pretreatment preserves the immunoreactivity of the cells best, panoptic staining with and without coverslipping, coverslipping without staining, and microwave treatment were tested. In this study, 186 lymph node fine-needle-aspiration and brain smear samples containing cellular antigens and 22 effusion samples containing feline coronavirus (FCoV) antigen were used. Immunoreactivity of the samples containing cellular antigens for ICC staining was preserved best by covering the panoptically stained cytologies in a mounting medium. An additional microwave treatment for antigen retrieval before ICC improved the ICC staining results comparable to the optimal results of unstained, frozen slides. Each pretreatment abolished the immunoreactivity of FCoV antigen and gave negative ICC results. Therefore, samples should be left unstained and stored frozen if a viral disease is possible.

Study II investigated the ICC for detection of the FCoV antigen in macrophages of the cerebrospinal fluid (CSF). CSF samples of 41 cats were evaluated for FCoV antigen-positive macrophages via ICC. In 21/41 cats, feline infectious peritonitis (FIP) was confirmed via positive immunohistochemical staining of altered organs. In 10/21 cats with neurological signs, post mortem investigation showed a central nervous system (CNS) manifestation of FIP with pyogranulomatous lesions within the CNS. In 20/41 cats, FIP was either excluded post mortem via immunohistochemical staining of all altered organs or FIP was excluded due to a survival time of the cats longer than 1.5 years. Seventeen of the 20 cats showed neurological signs. CSF samples were also evaluated regarding type of pleocytosis and whether a FIP-typical cell population was present. Further, fibrin content, blood contamination and number of macrophages positive for FCoV antigen in the ICC were analysed. FIP was correctly diagnosed via ICC staining of CSF in 81.0 % of the cats with immunohistochemically confirmed FIP. The ICC of the CSF thus, had a sensitivity of 85.0 % and was higher in cats with FIP without CNS involvement (90.1 %) than in cats with a CNS manifestation of FIP (77.8 %). The specificity of the ICC (83.3 %) was not as high as in other studies. Consequently, negative ICC results do not exclude FIP. As false-positive results can occur, positive ICC

stainings should be interpreted with caution and only in combination with signalement, clinical signs and laboratory changes.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Abendroth CS, Dabbs DJ. Immunocytochemical staining of unstained versus previously stained cytologic preparations. *Acta Cytol.* 1995; 39: 379-86.

Adams RL, Springall DR, Levene MM, Bushell TE. The immunocytochemical detection of herpes simplex virus in cervical smears - a valuable technique for routine use. *J Pathol* 1984; 143: 241-7.

Addie D, Jarrett O. Feline coronavirus antibodies in cats. *Vet Res.* 1992; 131: 202-3.

Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 2009; 11: 594-604.

Addie D. Feline coronavirus infections. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 4th ed. Greene CE. Missouri: Elsevier - Saunders, 2012. p. 92-108.

Addie DD. Clustering of feline coronaviruses in multicat households. *Vet J.* 2000; 159: 8-9.

An DJ, Jeoung HY, Jeong W, Chae S, Song DS, Oh JS, Park BK. A serological survey of canine respiratory coronavirus and canine influenza virus in Korean dogs. *J Vet Med Sci.* 2010; 72: 1217-9.

Autieri CR, Miller CL, Scott KE, Kilgore A, Papscoe VA, Garner MM, Haupt JL, Bakthavatchalu V, Muthupalani S, Fox JG. Systemic Coronaviral Disease in 5 Ferrets. *Comp Med.* 2015; 65: 508-16.

Balint A, Farsang A, Zadori Z, Hornyak A, Dencso L, Almazan F, Enjuanes L, Belak S. Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism. *J Virol.* 2012; 86: 6258-

67.

Battilani M, Balboni A, Bassani M, Scagliarini A, Paltrinieri S, Prosperi S. Sequence analysis of the nucleocapsid gene of feline coronaviruses circulating in Italy. *New Microbiol.* 2010; 33: 387-92.

Bell ET, Malik R, Norris JM. The relationship between the feline coronavirus antibody titre and the age, breed, gender and health status of australian cats. *Aust Vet J.* 2006; 84: 2-7.

Beraki E, Olsen TK, Sauer T. Establishing a protocol for immunocytochemical staining and chromogenic in situ hybridization of Giemsa and Diff-Quick prestained cytological smears. *Cytojournal.* 2012; 9: 2-8.

Berg AL, Ekman K, Belák S, Berg M. Cellular composition and interferon-gamma expression of the local inflammatory response in feline infectious peritonitis (FIP). *Vet Microbiol.* 2005;111(1-2):15-23.

Binn LN, Lazar EC, Keenan KP, Huxsoll DL, Marchwicki RH, Strano AJ. Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc.* 1974; 78: 359-66.

Boettcher IC, Steinberg T, Matiassek K, Greene CE, Hartmann K, Fischer A. Use of anti-coronavirus antibody testing of cerebrospinal fluid for diagnosis of feline infectious peritonitis involving the central nervous system in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2007; 230: 199-205.

Bolton SJ, Anthony DC, Perry VH. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience.* 1998; 86: 1245-57.

Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion

core complex. *J Virol*. 2003;77: 8801-11.

Brown MA. Genetic determinants of pathogenesis by feline infectious peritonitis virus. 2011; 143: 265-8.

Brown MA, Troyer JL, Pecon-Slattery J, Roelke ME, O'Brien SJ. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15: 1445-52.

Buonavoglia C, Decaro N, Martella V, Elia G, Campolo M, Desario C, Castagnaro M, Tempesta M. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12: 492-4.

Buonavoglia C, Martella V. Canine respiratory viruses. *Vet Res*. 2007; 38: 355-73.

Cajulis RS, Szumel R, Frias-Hidvegi D, Combs SG, Radosevich JA. Monoclonal antibody 44-3A6 as an adjunct in cytodiagnosis of adenocarcinomas in body fluids. *Diagn Cytopathol*. 1993; 9: 179-83.

Cameron MJ, Kelvin AA, Leon AJ, Cameron CM, Ran L, Xu L, Chu YK, Danesh A, Fang Y, Li Q, Anderson A, Couch RC, Paquette SG, Fomukong NG, Kistner O, Lauchart M, Rowe T, Harrod KS, Jonsson CB, Kelvin DJ. Lack of innate interferon responses during SARS coronavirus infection in a vaccination and reinfection ferret model. *PLoS One*. 2012; 7: 1-16.

Can-Sahna K, Soydal Ataseven V, Pinar D, Oguzoglu TC. The detection of feline coronaviruses in blood samples from cats by mRNA RT-PCR. *J Feline Med Surg*. 2007; 9: 369-72.

Carmichael LE, Binn LN. New enteric viruses in the dog. *Adv Vet Sci Comp Med*. 1981; 25: 1-37.

Chang CK, Jeyachandran S, Hu NJ, Liu CL, Lin SY, Wang YS, Chang YM, Hou

MH. Structure-based virtual screening and experimental validation of the discovery of inhibitors targeted towards the human coronavirus nucleocapsid protein. *Mol Biosyst.* 2016; 12: 59-66.

Chang HW, de Groot RJ, Egberink HF, Rottier PJ. Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *J Gen Virol.* 2010; 91: 415-20.

Chang HW, Egberink HF, Halpin R, Spiro DJ, Rottier PJ. Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18: 1089-95.

Chapman MD, Hughes LE, Wilson CD, Namnyak S, Thompson EJ, Giovannoni G. No evidence for production of intrathecal immunoglobulin G against *Acinetobacter* or *Pseudomonas* in multiple sclerosis. *Eur Neurol.* 2005; 53: 27-31.

Cheng L, Reiter RE, Jin Y, Sharon H, Wieder J, Lane TF, Rao J. Immunocytochemical analysis of prostate stem cell antigen as adjunct marker for detection of urothelial transitional cell carcinoma in voided urine specimens. *J Urol.* 2003; 169: 2094-100.

Choi US, Kim DY. Immunocytochemical detection of Ki-67 in Diff-Quik-stained cytological smears of canine mammary gland tumours. *Cytopathology.* 2011; 22: 115-20.

Corkill ME, Katz R. Immunocytochemical staining of c-erb B-2 oncogene in fine-needle aspirates of breast carcinoma: a comparison with tissue sections and other breast cancer prognostic factors. *Diagn Cytopathol.* 1994; 11: 250-4.

Cornelissen E, Dewerchin HL, Van Hamme E, Nauwynck HJ. Absence of surface expression of feline infectious peritonitis virus (FIPV) antigens on infected cells isolated from cats with FIP. *Vet Microbiol.* 2007;121(1-2):131-7.

Cornelissen E, Dewerchin HL, Van Hamme E, Nauwynck HJ. Absence of

antibody-dependent, complement-mediated lysis of feline infectious peritonitis virus-infected cells. *Virus Res.* 2009; 144: 285-9.

Cross SS, Start RD, Smith JH. Does delay in fixation affect the number of mitotic figures in processed tissue? *J Clin Pathol.* 1990; 43: 597-9.

Dabbs DJ, Wang X. Immunocytochemistry on cytologic specimens of limited quantity. *Diagn Cytopathol.* 1998; 18: 166-9.

Darvishian F, Stier EA, Soslow RA, Lin O. Immunoreactivity of p16 in anal cytology specimens: histologic correlation. *Cancer.* 2006; 108: 66-71.

De Groot-Mijnes JD, van Dun JM, van der Most RG, de Groot RJ. Natural history of a recurrent feline coronavirus infection and the role of cellular immunity in survival and disease. *J Virol.* 2005; 79: 1036-44.

De Vries AAF, Horzinek MC, Rottier PJM, De Groot RJ. The genome organization of the Nidovirales: similarities and differences between Artery-, Toro- and Coronaviruses. *Semin Virol.* 1997; 8: 33-47.

Dean GA, Olivry T, Stanton C, Pedersen NC. In vivo cytokine response to experimental feline infectious peritonitis virus infection. *Vet Microbiol.* 2003; 97: 1-12.

Decaro N, Desario C, Elia G, Mari V, Lucente MS, Cordioli P, Colaianni ML, Martella V, Buonavoglia C. Serological and molecular evidence that canine respiratory coronavirus is circulating in Italy. *Vet Microbiol.* 2007; 121: 225-30.

Decaro N, Buonavoglia C. An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. *Vet Microbiol.* 2008; 132: 221-34.

Decaro N, Campolo M, Lorusso A. Experimental infection of dogs with a novel strain of canine coronavirus causing systemic disease and lymphopenia. *Vet*

Microbiol. 2008; 128: 253-60.

Decaro N, Mari V, Campolo M, Lorusso A, Camero M, Elia G, Martella V, Cordioli P, Enjuanes L, Buonavoglia C. Recombinant canine coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus of swine are circulating in dogs. *J Virol.* 2009; 83: 1532-7.

Decaro N, Buonavoglia C. Canine coronavirus: not only an enteric pathogen. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2011; 41: 1121-32.

Decaro N, Mari V, von Reitzenstein M, Lucente MS, Cirone F, Elia G, Martella V, King VL, Di Bello A, Varello K, Zhang S, Caramelli M, Buonavoglia C. A pantropic canine coronavirus genetically related to the prototype isolate CB/05. *Vet Microbiol.* 2012; 159: 239-44.

Decaro N, Cordonnier N, Demeter Z, Egberink H, Elia G, Grellet A, Le Poder S, Mari V, Martella V, Ntafis V, von Reitzenstein M, Rottier PJ, Rusvai M, Shields S, Xylouri E, Xu Z, Buonavoglia C. European surveillance for pantropic canine coronavirus. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 83-8.

Decaro N, Mari V, Elia G, Lanave G, Dowgier G, Colaianni ML, Martella V, Buonavoglia C. Full-length genome analysis of canine coronavirus type I. *Virus Res.* 2015; 210: 100-5.

Decaro N, Mari V, Larocca V, Losurdo M, Lanave G, Lucente MS, Corrente M, Catella C, Bo S, Elia G, Torre G, Grandolfo E, Martella V, Buonavoglia C. Molecular surveillance of traditional and emerging pathogens associated with canine infectious respiratory disease. *Vet Microbiol.* 2016; 192: 21-5.

Dedeurwaerder A, Desmarets LM, Olyslaegers DA, Vermeulen BL, Dewerchin HL, Nauwynck HJ. The role of accessory proteins in the replication of feline infectious peritonitis virus in peripheral blood monocytes. *Vet Microbiol.* 2013; 162: 447-55.

Demirezen S, Kakudo K, Kawashima T, Katsuoka Y, Osamura RY. Immunocytochemical detection of *Chlamydia trachomatis* on cytological specimens. *J Exp Clin Med*. 1986; 11: 229-34.

Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E. Intrathecal antibody (IgG) production against human herpesvirus type 6 occurs in about 20% of multiple sclerosis patients and might be linked to a polyspecific B-cell response. *J Neurol*. 2005; 252: 968-71.

Dewerchin HL, Cornelissen E, Nauwynck HJ. Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. *Arch Virol*. 2005;150(12):2483-500.

Dewerchin HL, Cornelissen E, Nauwynck HJ. Feline infectious peritonitis virus-infected monocytes internalize viral membrane-bound proteins upon antibody addition. *J Gen Virol*. 2006; 87: 1685-90.

Dewerchin HL, Cornelissen E, Van Hamme E, Smits K, Verhasselt B, Nauwynck HJ. Surface-expressed viral proteins in feline infectious peritonitis virus-infected monocytes are internalized through a clathrin- and caveolae-independent pathway. *J Gen Virol*. 2008; 89: 2731-40.

Dewey CW, Ducoté JM. Neurodiagnostics. In: Dewey CW, editor. *A practical Guide to Canine & Feline Neurology*. Iowa: Wiley-Blackwell; 2008. p. 75-6.

Diaz JV, Poma R. Diagnosis and clinical signs of feline infectious peritonitis in the central nervous system. *Can Vet J*. 2009; 50: 1091-3.

Doenges SJ, Weber K, Dorsch R, Fux R, Fischer A, Matiassek LA, Matiassek K, Hartmann K. Detection of feline coronavirus in cerebrospinal fluid for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats with and without neurological signs. *J Feline Med Surg*. 2016; 18: 104-9.

Dominguez E, Novellas R, Moya A, Espada Y, Martorell J. Abdominal radiographic and ultrasonographic findings in ferrets (*Mustela putorius furo*) with

systemic coronavirus infection. *Vet Rec.* 2011; 169: 231-8.

Doria-Torra G, Vidana B, Ramis A, Amarilla SP, Martinez J. Coronavirus infection in ferrets: antigen distribution and inflammatory response. *Vet Pathol.* 2016; 53: 1-7.

Dye C, Siddell SG. Genomic RNA sequence of Feline coronavirus strain FIPV WSU-79/1146. *J Gen Virol.* 2005; 86: 2249-2253

Egberink HF, Herrewegh AP, Schuurman NM, van der Linde-Sipman JS, Horzinek MC, de Groot RJ. FIP, easy to diagnose? *Vet Q.* 1995; 17: 24-5.

Eifart P. Visualisierung und Charakterisierung der S-Protein vermittelten Fusion von Coronaviren [Dissertation]. Berlin: Humboldt-Universität zu Berlin; 2007.

Ejersbo D, Jensen HA, Holund B. Efficacy of Ki-67 antigen staining in Papanicolaou (Pap) smears in post-menopausal women with atypia - an audit. *Cytopathology.* 1999; 10: 369-74.

Ellis JA, McLean N, Hupaelo R, Haines DM. Detection of coronavirus in cases of tracheobronchitis in dogs: a retrospective study from 1971 to 2003. *Can Vet J.* 2005; 46: 447-8.

Engelhardt B, Wolburg H. Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: Through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol.* 2004; 34: 2955-63.

Erles K, Toomey C, Brooks HW, Brownlie J. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology.* 2003; 310: 216-23.

Erles K, Dubovi EJ, Brooks HW, Brownlie J. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 4524-9.

Erles K, Brownlie J. Canine respiratory coronavirus: an emerging pathogen in the canine infectious respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008; 38: 815-25.

Espina V, Mueller C, Edmiston K, Sciro M, Petricoin EF, Liotta LA. Tissue is alive: New technologies are needed to address the problems of protein biomarker pre-analytical variability. *Proteomics Clin Appl.* 2009; 3: 874-82.

Eusebi V, Bondi A, Rosai J. Immunohistochemical localization of myoglobin in nonmuscular cells. *Am J Surg Pathol.* 1984; 8: 51-5.

Evermann JF, Abbott JR, Han S. Canine coronavirus-associated puppy mortality without evidence of concurrent canine parvovirus infection. *J Vet Diagn Invest.* 2005; 17: 610-4.

Felten S, Matiasek K, Gruendl S, Sangl L, Wess G, Hartmann K. Investigation into the utility of an immunocytochemical assay in body cavity effusions for diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg.* 2017a; 19: 410-8.

Felten S, Weider K, Doenges S, Gruendl S, Matiasek K, Hermanns W, Mueller E, Matiasek L, Fischer A, Weber K, Hirschberger J, Wess G, Hartmann K. Detection of feline coronavirus spike gene mutations as a tool to diagnose feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg.* 2017b; 19: 321-35.

Fischer Y, Sauter-Louis C, Hartmann K. Diagnostic accuracy of the Rivalta test for feline infectious peritonitis. *Vet Clin Pathol.* 2012; 41: 558-67.

Foley JE, Poland A, Carlson J, Pedersen NC. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *J Am Vet Med Assoc.* 1997; 210: 1313-8.

Foley JE, Lapointe JM, Koblik P, Poland A, Pedersen NC. Diagnostic features of clinical neurologic feline infectious peritonitis. *J Vet Int Med.* 1998; 12: 415-23.

Foley JE, Leutenegger C. A review of coronavirus infection in the central nervous system of cats and mice. *J Vet Int Med.* 2001; 15: 438-44.

Foley JE, Rand C, Leutenegger C. Inflammation and changes in cytokine levels in neurological feline infectious peritonitis. *J Feline Med Surg.* 2003; 5: 313-22.

Fry MM, Vernau W, Kass PH, Vernau KM. Effects of time, initial composition, and stabilizing agents on the results of canine cerebrospinal fluid analysis. *Vet Clin Pathol.* 2006; 35: 72-7.

Gao FS, Hu GX, Xia XZ, Gao YW, Bai YD, Zou XH. Isolation and identification of a canine coronavirus strain from giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *J Vet Sci.* 2009; 10: 261-3.

Garner MM, Ramsell K, Morera N, Juan-Salles C, Jimenez J, Ardiaca M, Montesinos A, Teifke JP, Lohr CV, Evermann JF, Baszler TV, Nordhausen RW, Wise AG, Maes RK, Kiupel M. Clinicopathologic features of a systemic coronavirus-associated disease resembling feline infectious peritonitis in the domestic ferret (*Mustela putorius*). *Vet Pathol.* 2008; 45: 236-46.

Gelain ME, Meli M, Paltrinieri S. Whole blood cytokine profiles in cats infected by feline coronavirus and healthy non-FCoV infected specific pathogen-free cats. *J Feline Med Surg.* 2006; 8: 389-99.

Giori L, Giordano A, Giudice C, Grieco V, Paltrinieri S. Performances of different diagnostic tests for feline infectious peritonitis in challenging clinical cases. *J Small Anim Pract.* 2011; 52: 152-7.

Golovko L, Lyons LA, Liu H, Sorensen A, Wehnert S, Pedersen NC. Genetic susceptibility to feline infectious peritonitis in Birman cats. *Virus Res.* 2013; 175: 58-63.

Gonon V, Duquesne V, Klonjowski B, Monteil M, Aubert A, Eloit M. Clearance

of infection in cats naturally infected with feline coronaviruses is associated with an anti-S glycoprotein antibody response. *J Gen Virol.* 1999; 80: 2315-7.

Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol.* 2000; 81: 2341-64.

Graham E, Lamm C, Denk D, Stidworthy MF, Carrasco DC, Kubiak M. Systemic coronavirus-associated disease resembling feline infectious peritonitis in ferrets in the UK. *Vet Rec.* 2012; 171: 200-1.

Graham RL, Donaldson EF, Baric RS. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11: 836-48.

Gunn-Moore DA, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol.* 1998; 62: 193-205.

Haagmans BL, Egberink HF, Horzinek MC. Apoptosis and T-cell depletion during feline infectious peritonitis. *J Virol.* 1996; 70: 8977-83.

Hagemeijer MC, Rottier PJ, de Haan CA. Biogenesis and dynamics of the coronavirus replicative structures. *Viruses.* 2012; 4: 3245-69.

Haijema BJ, Volders H, Rottier PJ. Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *J Virol.* 2004; 78: 3863-71.

Hartmann K, Binder C, Hirschberger J, Cole D, Reinacher M, Schroo S, Frost J, Egberink H, Lutz H, Hermanns W. Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. *J Vet Int Med.* 2003; 17: 781-90.

Hartmann K. Feline infectious peritonitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2005; 35: 39-79.

Hayat MA, Giaquinta R. Rapid fixation and embedding for electron microscopy. *Tissue Cell.* 1970; 2: 191-5.

Herrewegh AA, de Groot RJ, Cepica A, Egberink HF, Horzinek MC, Rottier PJ. Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol.* 1995a; 33: 684-9.

Herrewegh AA, Vennema H, Horzinek MC, Rottier PJ, de Groot RJ. The molecular genetics of feline coronaviruses: comparative sequence analysis of the ORF7a/7b transcription unit of different biotypes. *Virology.* 1995b; 212: 622-31.

Hewitt SM, Robinowitz M, Bogen SA, Gown AM, Kalra KL, Otis CN, Spaulding B, Taylor CR. Quality assurance for design control and implementation of immunohistochemistry assays: approved guideline, 2nd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011. p. 1-138.

Hirschberger J, Hartmann K, Wilhelm N, Frost J, Lutz H, Kraft W. [Clinical symptoms and diagnosis of feline infectious peritonitis]. *Tierärztl Prax.* 1995; 23: 92-9.

Hoinghaus R, Mischke R, Hewicker-Trautwein M. Use of immunocytochemical techniques in canine melanoma. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2002; 49: 198-202.

Holzworth J. Some important disorders of cats. *Cornell Vet.* 1963; 53: 157-60.

Ives EJ, Vanhaesebrouck AE, Cian F. Immunocytochemical demonstration of feline infectious peritonitis virus within cerebrospinal fluid macrophages. *J Feline Med Surg.* 2013; 15: 1149-53.

Iwa N, Yutani C, Ishibashi-Ueda H, Katayama Y. Immunocytochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in imprint smears of human brain tumors. *Diagn Cytopathol.* 1988; 4: 74-7.

Jacobse-Geels HE. Antibody, immune complexes, and complement activity fluctuations in kittens with experimentally induced feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res.* 1982; 43: 666-70.

Jorundsson E, Lumsden JH, Jacobs RM. Rapid staining techniques in cytopathology: a review and comparison of modified protocols for hematoxylin and eosin, Papanicolaou and Romanowsky stains. *Vet Clin Pathol.* 1999; 28: 100-8.

Kaneshima T, Hohdatsu T, Satoh K, Takano T, Motokawa K, Koyama H. The prevalence of a group 2 coronavirus in dogs in Japan. *J Vet Med Sci.* 2006; 68: 21-5.

Kawaoi A, Okano T, Nemoto N, Shiina Y, Shikata T. Simultaneous detection of thyroglobulin (Tg), thyroxine (T4), and Triiodothyronine (T3) in nontoxic thyroid tumors by the immunoperoxidase method. *Am J Pathol.* 1982; 108: 39-49.

Kennedy M, Boedeker N, Gibbs P, Kania S. Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol.* 2001; 81: 227-34.

Kennedy MA, Brenneman K, Millsaps RK, Black J, Potgieter LN. Correlation of genomic detection of feline coronavirus with various diagnostic assays for feline infectious peritonitis. *J Vet Diagn Invest.* 1998; 10: 93-7.

Kim DH, Kwon MS. Role of fine needle aspiration cytology, cell block preparation and CD63, P63 and CD56 immunostaining in classifying the specific tumor type of the lung. *Acta Cytol.* 2010; 54: 55-9.

Kipar A, Bellmann S, Kremendahl J, Kohler K, Reinacher M. Cellular composition,

coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998; 65: 243-57.

Kipar A, Koehler K, Bellmann S, Reinacher M. Feline infectious peritonitis presenting as a tumour in the abdominal cavity. *Vet Rec.* 1999; 144: 118-22.

Kipar A, Kohler K, Leukert W, Reinacher M. A comparison of lymphatic tissues from cats with spontaneous feline infectious peritonitis (FIP), cats with FIP virus infection but no FIP, and cats with no infection. *J Comp Pathol.* 2001; 125: 182-91.

Kipar A, Kremendahl J, Addie DD, Leukert W, Grant CK, Reinacher M. Fatal enteritis associated with coronavirus infection in cats. *J Comp Pathol.* 1998; 119: 1-14.

Kipar A, May H, Menger S, Weber M, Leukert W, Reinacher M. Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Vet Pathol.* 2005; 42: 321-30.

Kipar A, Meli ML, Baptiste KE, Bowker LJ, Lutz H. Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *J Gen Virol.* 2010; 91: 1698-707.

Kipar A, Meli ML. Feline infectious peritonitis: still an enigma? *Vet Pathol.* 2014; 51: 505-26.

Kirbis IS, Flezar MS, Krasovec MU. MIB-1 immunostaining on cytological samples: a protocol without antigen retrieval. *Cytopathology.* 2004; 15: 154-9.

Kirbis IS, Maxwell P, Flezar MS, Miller K, Ibrahim M. External quality control for immunocytochemistry on cytology samples: a review of UK NEQAS ICC (cytology module) results. *Cytopathology.* 2011; 22: 230-7.

Kline KL, Joseph RJ, Averill DR. Feline infectious peritonitis with neurological involvement: clinical and pathological findings in 24 cats. *J Am Anim Hosp Assoc.*

1994; 30: 111-8.

Konsman JP, Drukarch B, van Dam AM. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci.* 2007; 112: 1-25.

Koyatsu J, Ishi K, Suzuki F, Saito A, Kina K, Okazaki T. Usefulness of estrogen receptor detection using archival Papanicolaou-stained smears. *Acta Cytol.* 1999; 43: 825-30.

Krishnamurthy S, Dimashkieh H, Patel S, Sneige N. Immunocytochemical evaluation of estrogen receptor on archival Papanicolaou-stained fine-needle aspirate smears. *Diagn Cytopathol.* 2003; 29: 309-14.

Lai MM. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol Rev.* 1992; 56: 61-79.

Le Poder S. Feline and canine coronaviruses: common genetic and pathobiological features. *Adv Virol.* 2011; 4: 1-11.

Licitra BN, Millet JK, Regan AD, Hamilton BS, Rinaldi VD, Duhamel GE, Whittaker GR. Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19: 1066-73.

Liess B, Moennig V. Virusinfektionen der Katzen. In: Liess B, Moenning V, Haas L, editors. *Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren*. Hannover: Schlütersche Verlag; 2010 p. 119-21.

Lin CN, Su BL, Wang CH, Hsieh MW, Chueh TJ, Chueh LL. Genetic diversity and correlation with feline infectious peritonitis of feline coronavirus type I and II: A 5-year study in Taiwan. *Vet Microbiol.* 2009; 136: 233-9.

Linaris GmbH. Mouse anti-feline coronavirus, monoclonal. Produktkatalog Linaris GmbH. catalogue number MAK2194. 2015.

Litster AL, Pogranichniy R, Lin TL. Diagnostic utility of a direct immunofluorescence test to detect feline coronavirus antigen in macrophages in effusive feline infectious peritonitis. *Vet J.* 2013; 198: 362-6.

Lorusso A, Decaro N, Schellen P, Rottier PJ, Buonavoglia C, Haijema BJ, de Groot RJ. Gain, preservation, and loss of a group 1a coronavirus accessory glycoprotein. *J Virol.* 2008; 82: 10312-7.

Lu S, Chen Y, Qin K, Zhou J, Lou Y, Tan W. Genetic and antigenic characterization of recombinant nucleocapsid proteins derived from canine coronavirus and canine respiratory coronavirus in China. *Sci China Life Sci.* 2016; 59: 615-21.

Marcos R, Santos M, Santos N, Malhao F, Ferreira F, Monteiro RA, Rocha E. Use of destained cytology slides for the application of routine special stains. *Vet Clin Pathol.* 2009; 38: 94-102.

Martinez J, Ramis AJ, Reinacher M, Perpignan D. Detection of feline infectious peritonitis virus-like antigen in ferrets. *Vet Rec.* 2006; 158: 523-4.

Martinez J, Reinacher M, Perpignan D, Ramis A. Identification of group 1 coronavirus antigen in multisystemic granulomatous lesions in ferrets (*Mustela putorius furo*). *J Comp Pathol.* 2008; 138: 54-8.

Mason DY, Gatter KC. The role of immunocytochemistry in diagnostic pathology. *J Clin Pathol.* 1987; 40: 1042-54.

Mayr A, Rolle M. Infektion und Krankheiten durch Coronaviren. In: Mayr A, editor. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Stuttgart: Enke Verlag; 2007 p. 245-57.

McKee PH. Immunocytochemistry and cutaneous neoplasia ('something will turn up', Micawber 1863). *Clin Exp Dermatol.* 1990; 15: 235-44.

Meinkoth JH, Cowell RL. Sample collection and preparation in cytology: increasing diagnostic yield. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2002; 32: 1187-207.

Meurer DG, Wolf S. Pathologie der Entzündungen. In: Meurer DG, Wolf S, editors. *Allgemeine Pathologie.* Stuttgart: Schattauer Verlag; 2007 p. 214-6.

Michimae Y, Mikami S, Okimoto K, Toyosawa K, Matsumoto I, Kouchi M, Koujitani T, Inoue T, Seki T. The first case of feline infectious peritonitis-like pyogranuloma in a ferret infected by coronavirus in Japan. *J Toxicol Pathol.* 2010; 23: 99-101.

Mihindukulasuriya KA, Wu G, St Leger J, Nordhausen RW, Wang D. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *J Virol.* 2008; 82: 5084-8.

Mitchell JA, Brooks H, Shiu KB, Brownlie J, Erles K. Development of a quantitative real-time PCR for the detection of canine respiratory coronavirus. *J Virol Methods.* 2009; 155: 136-42.

Mitchell JA, Brooks HW, Szladovits B, Erles K, Gibbons R, Shields S, Brownlie J. Tropism and pathological findings associated with canine respiratory coronavirus (CRCoV). *Vet Microbiol.* 2013; 162: 582-94.

Modrow S, Falke D. Viren: Definition, Aufbau, Einteilung. In: Modrow S, editor. *Molekulare Virologie.* München: Elsevier Verlag; 2010 p. 13-21.

Monaco SE, Dabbs DJ. Immunocytochemistry. In: Bibbo M, Wilbur DC, editors. *Comprehensive Cytopathology.* Philadelphia: Elsevier; 2015 p. 892-912.

Murray J, Kiupel M, Maes RK. Ferret coronavirus-associated diseases. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2010; 13: 543-60.

Mwase M, Shimada K, Mumba C, Yabe J, Squarre D, Madarame H. Positive immunolabelling for feline infectious peritonitis in an African lion (*Panthera leo*) with bilateral panuveitis. *J Comp Pathol.* 2015; 152: 265-8.

Myrrha LW, Silva FM, Peternelli EF, Junior AS, Resende M, de Almeida MR. The paradox of feline coronavirus pathogenesis: a review. *Adv Virol.* 2011; 11: 1-8.

Nordgard S, Bofin A, Hagmar B. Ki-67 antigen detection in unstained and destained cytologic samples. *Anal Quant Cytol Histol.* 2002; 24: 198-204.

Norris JM, Bosward KL, White JD, Baral RM, Catt MJ, Malik R. Clinicopathological findings associated with feline infectious peritonitis in Sydney, Australia: 42 cases (1990-2002). *Aust Vet J.* 2005; 83: 666-73.

Ntafis V, Mari V, Decaro N, Papanastassopoulou M, Pardali D, Rallis TS, Kanellos T, Buonavoglia C, Xylouri E. Canine coronavirus, Greece. Molecular analysis and genetic diversity characterization. *Infect Genet Evol.* 2013; 16: 129-36.

Oza N, Sanghvi K, Shet T, Patil A, Menon S, Ramadwar M, Kane S. Mammary analogue secretory carcinoma of parotid: Is preoperative cytological diagnosis possible? *Diagn Cytopathol.* 2016; 44: 519-25.

Paltrinieri S, Cammarata MP, Cammarata G, Comazzi S. Some aspects of humoral and cellular immunity in naturally occurring feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998; 65: 205-20.

Paltrinieri S, Ponti W, Comazzi S, Giordano A, Poli G. Shifts in circulating lymphocyte subsets in cats with feline infectious peritonitis (FIP): pathogenic role and diagnostic relevance. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 96: 141-8.

Parodi MC, Cammarata G, Paltrinieri S, Lavazza A, Ape F. Using direct immunofluorescence to detect coronaviruses in perineal and pleural effusions. *J Small Anim Pract.* 1993; 34: 609-13.

Pasternak AO, Spaan WJ, Snijder EJ. Nidovirus transcription: how to make sense...? *J Gen Virol.* 2006; 87: 1403-21.

Pedersen NC. Serologic studies of naturally occurring feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res.* 1976a; 37: 1449-53.

Pedersen NC. Feline infectious peritonitis: something old, something new. *Fel Pract.* 1976b; 6: 42-51.

Pedersen NC, Boyle JF, Floyd K, Fudge A, Barker J. An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res.* 1981; 42: 368-77.

Pedersen NC. An overview of feline enteric coronavirus and feline infectious peritonitis virus infection. *Fel Pract.* 1995; 23: 7-20.

Pedersen NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. *J Feline Med Surg.* 2009; 11: 225-58.

Pedersen NC, Liu H, Dodd KA, Pesavento PA. Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis. *Viruses.* 2009; 1: 166-84.

Pedersen NC, Liu H, Scarlett J, Leutenegger CM, Golovko L, Kennedy H, Kamal FM. Feline infectious peritonitis: role of the feline coronavirus 3c gene in intestinal tropism and pathogenicity based upon isolates from resident and adopted shelter cats. *Virus Res.* 2012; 165: 17-28.

Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: virology and immunopathogenesis. *Vet J.* 2014a; 201: 123-32.

Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: diagnostics and therapeutics. *Vet J.* 2014b; 201: 133-41.

Pedersen NC, Boyle JF. Immunologic phenomena in the effusive form of feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res.* 1980; 41: 868-76.

Pedersen NC, Liu H, Durden M, Lyons LA. Natural resistance to experimental feline infectious peritonitis virus infection is decreased rather than increased by positive genetic selection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016; 171: 17-20.

Poland AM, Vennema H, Foley JE, Pedersen NC. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 3180-4.

Pratelli A, Martella V, Pistello M, Elia G, Decaro N, Buonavoglia D, Camero M, Tempesta M, Buonavoglia C. Identification of coronaviruses in dogs that segregate separately from the canine coronavirus genotype. *J Virol Methods.* 2003; 107: 213-22.

Priestnall SL, Brownlie J, Dubovi EJ, Erles K. Serological prevalence of canine respiratory coronavirus. *Vet Microbiol.* 2006; 115: 43-53.

Provacia LB, Smits SL, Martina BE, Raj VS, Doel PV, Amerongen GV, Moorman-Roest H, Osterhaus AD, Haagmans BL. Enteric coronavirus in ferrets, The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17: 1570-1.

Quesenberry KE, Hofer HL, Fox JG, Bell JA. Gastrointestinal Diseases. In: Quesenberry KE, Carpenter JW, editors. *Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*, 3rd ed. Missouri: Elsevier - Saunders; 2012 p. 37-8.

Ramos-Vara JA, Miller MA. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique. *Vet Pathol.* 2014; 51: 42-87.

Reiber H. Cerebrospinal fluid data compilation and knowledge-based interpretation of bacterial, viral, parasitic, oncological, chronic inflammatory and demyelinating

diseases. Diagnostic patterns not to be missed in neurology and psychiatry. *Arq Neuropsiquiatr.* 2016; 74: 337-50.

Rierner F, Kuehner KA, Ritz S, Sauter-Louis C, Hartmann K. Clinical and laboratory features of cats with feline infectious peritonitis - a retrospective study of 231 confirmed cases (2000-2010). *J Feline Med Surg.* 2016; 18: 348-56.

Robison RL, Holzworth J, Gilmore CE. Naturally occurring feline infectious peritonitis: signs and clinical diagnosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1971; 158: 981-6.

Rottier PJ, Nakamura K, Schellen P, Volders H, Haijema BJ. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J Virol.* 2005; 79: 14122-30.

Satoh R, Kaku A, Satomura M, Kohori M, Noura K, Furukawa T, Kotake M, Takano T, Hohdatsu T. Development of monoclonal antibodies (MAbs) to feline interferon (fIFN)-gamma as tools to evaluate cellular immune responses to feline infectious peritonitis virus (FIPV). *J Feline Med Surg.* 2011; 13: 427-35.

Schulz BS, Kurz S, Weber K, Balzer HJ, Hartmann K. Detection of respiratory viruses and *Bordetella bronchiseptica* in dogs with acute respiratory tract infections. *Vet J.* 2014; 201: 365-9.

Selbitz H, König M, Thiel HJ. Familie Coronaviridae. In: Selbitz H, Truyen U, Weigand P, editors. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* Stuttgart: Enke Verlag; 2010 p. 580-98.

Sharif S, Arshad SS, Hair-Bejo M, Omar AR, Zeenathul NA, Alazawy A. Diagnostic methods for feline coronavirus: a review. *Vet Med Int.* 2010; doi: 10.4061/2010/809480.

Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J*

Histochem Cytochem. 2001; 49: 931-7.

Shtilbans V, Szporn AH, Wu M, Burstein DE. p63 immunostaining in destained bronchoscopic cytological specimens. *Diagn Cytopathol.* 2005; 32: 198-203.

Skoog L, Tani E. Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology.* 2011; 22: 215-29.

Slauson DO, Finn JP. Meningoencephalitis and panophthalmitis in feline infectious peritonitis. *J Am Vet Med Assoc.* 1972; 160: 729-34.

Soma T, Ishii H. Detection of feline coronavirus antibody, feline immunodeficiency virus antibody, and feline leukemia virus antigen in ascites from cats with effusive feline infectious peritonitis. *J Vet Med Sci.* 2004; 66: 89-90.

Stadler K, Maignani V, Eickmann M, Becker S, Abrignani S, Klenk HD, Rappuoli R. SARS-beginning to understand a new virus. *Nat Rev Microbiol.* 2003;1(3):209-18.

Stanta G, Carcangiu ML, Rosai J. The biochemical and immunohistochemical profile of thyroid neoplasia. *Pathol Annu.* 1988; 23: 129-57.

Steinberg TA, Boettcher IC, Matiassek K, Hirschvogel K, Hartmann K, Kunz A, Fischer A. Use of albumin quotient and IgG index to differentiate blood- vs brain-derived proteins in the cerebrospinal fluid of cats with feline infectious peritonitis. *Vet Clin Pathol.* 2008; 37: 207-16.

Storch-Hagenlocher B, Reiber H, Wildemann B, Otto M. Liquordiagnostik. In: Wildemann B, Oschmann P, Reiber H, editors. *Neurologische Labordiagnostik.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006; p. 30-73

Suthipintawong C, Leong AS, Vinyuvat S. Immunostaining of cell preparations: a comparative evaluation of common fixatives and protocols. *Diagn Cytopathol.*

1996; 15: 167-74.

Takano T, Tomiyama Y, Katoh Y. Mutation of neutralizing/antibody-dependent enhancing epitope on spike protein and 7b gene of feline infectious peritonitis virus: influences of viral replication in monocytes/macrophages and virulence in cats. *Virus Res.* 2011; 156: 72-80.

Tamke PG, Petersen MG, Dietze AE, Delahunta A. Acquired hydrocephalus and hydromyelia in a cat with feline infectious peritonitis: A case report and brief review. *Can Vet J.* 1988; 29: 997-1000.

Tammer R, Evensen O, Lutz H, Reinacher M. Immunohistological demonstration of feline infectious peritonitis virus antigen in paraffin-embedded tissues using feline ascites or murine monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995; 49: 177-82.

Tennant BJ, Gaskell RM, Kelly DF, Carter SD, Gaskell CJ. Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. *Res Vet Sci.* 1991; 51: 11-8.

Tennant BJ, Gaskell RM, Jones RC, Gaskell CJ. Studies on the epizootiology of canine coronavirus. *Vet Rec.* 1993; 132: 7-11.

Tutar Y. Pseudogenes. *Comp Funct Genomics.* 2012; doi:10.1155/2012/424526

Van den Brand JM, Haagmans BL, Leijten L, van Riel D, Martina BE, Osterhaus AD, Kuiken T. Pathology of experimental SARS coronavirus infection in cats and ferrets. *Vet Pathol.* 2008; 45: 551-62.

Vennema H, Poland A, Foley J, Pedersen NC. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology.* 1998; 243: 150-7.

Vlasova AN, Zhang X, Hasoksuz M, Nagesha HS, Haynes LM, Fang Y, Lu S, Saif

LJ. Two-way antigenic cross-reactivity between severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and group 1 animal CoVs is mediated through an antigenic site in the N-terminal region of the SARS-CoV nucleoprotein. *J Virol.* 2007; 81: 13365-77.

Vogel L, van der Lubben M, te Lintelo EG, Bekker CP, Geerts T, Schuijff LS, Grinwis GC, Egberink HF, Rottier PJ. Pathogenic characteristics of persistent feline enteric coronavirus infection in cats. *Vet Res.* 2010; 41: 71-83.

Weiss RC, Scott FW. Pathogenesis of feline infectious peritonitis: nature and development of viremia. *Am J Vet Res* 1981a; 42: 382-90.

Weiss RC, Scott FW. Antibody-mediated enhancement of disease in feline infectious peritonitis: comparisons with dengue hemorrhagic fever. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1981b; 4: 175-89.

Williams BH, Kiupel M, West KH, Raymond JT, Grant CK, Glickman LT. Coronavirus-associated epizootic catarrhal enteritis in ferrets. *J Am Vet Med Assoc.* 2000; 217: 526-30.

Wise AG, Kiupel M, Maes RK. Molecular characterization of a novel coronavirus associated with epizootic catarrhal enteritis (ECE) in ferrets. *Virology.* 2006; 349: 164-74.

Wise AG, Kiupel M, Garner MM, Clark AK, Maes RK. Comparative sequence analysis of the distal one-third of the genomes of a systemic and an enteric ferret coronavirus. *Virus Res.* 2010; 149: 42-50.

Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Engelhardt B. Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta Neuropathol.* 2005; 109: 181-90.

Woo PC, Huang Y, Lau SK, Yuen KY. Coronavirus genomics and bioinformatics

analysis. *Viruses*. 2010; 2: 1804-20.

Woo PC, Lau SK, Lam CS, Tsang AK, Hui SW, Fan RY, Martelli P, Yuen KY. Discovery of a novel bottlenose dolphin coronavirus reveals a distinct species of marine mammal coronavirus in Gammacoronavirus. *J Virol*. 2014; 88: 1318-31.

Worthing KA, Wigney DI, Dhand NK, Fawcett A, McDonagh P, Malik R, Norris JM. Risk factors for feline infectious peritonitis in Australian cats. *J Feline Med Surg*. 2012; 14: 405-12.

Xia S, Liu Q, Wang Q, Sun Z, Su S, Du L, Ying T, Lu L, Jiang S. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) entry inhibitors targeting spike protein. *Virus Res*. 2014; 194: 200-10.

Yachi A, Mochizuki M. Survey of dogs in Japan for group 2 canine coronavirus infection. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 2615-8.

Zhang L, Krausz T, DeMay RM. A pilot study of Galectin-3, HBME-1, and p27 triple immunostaining pattern for diagnosis of indeterminate thyroid nodules in cytology with correlation to histology. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015; 23: 481-90.

Zicola A, Jolly S, Mathijs E, Ziant D, Decaro N, Mari V, Thiry E. Fatal outbreaks in dogs associated with pantropic canine coronavirus in France and Belgium. *J Small Anim Pract*. 2012; 53: 297-300.

X. ANHANG

1. Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Überblick über Coronavirusinfektionen bei Säugern. 3

Tabelle 2: Funktion der Strukturproteine und Enzyme der Coronaviren. 11

*Tabelle 3: Struktur- und Nichtstrukturproteine der feline Coronaviren mit
Funktion und Auswirkung auf die Entstehung der FIP..... 17*

2. **Abbildungsverzeichnis:**

<i>Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Abbildung eines Coronavirus (Truthahn-Coronavirus).</i>	6
<i>Abbildung 2: Genomischer Aufbau eines Coronavirus.</i>	7
<i>Abbildung 3: Replikation der Coronaviren.</i>	8
<i>Abbildung 4: Morphologie eines Coronavirus.</i>	9
<i>Abbildung 5: Struktur des Spikeproteins eines Coronavirus.</i>	10
<i>Abbildung 6: Genetischer Aufbau des systemischen Frettchen-Coronavirus und des felineen Coronavirus.</i>	29
<i>Abbildung 7: Genomischer Aufbau von caninen Coronaviren und felineen Coronaviren.</i>	35

XI. DANKSAGUNG

Ich danke meinen Betreuern Prof. Katrin Hartmann, Dr. Lara Matiasek und Prof. Kaspar Matiasek für die zur Verfügungstellung des Themas für meine Doktorarbeit an der Medizinischen Kleintierklinik. Zudem danke ich ihnen für die permanente Betreuung und die stetige Unterstützung, die sie mir durchwegs entgegen gebracht haben. Durch kritische Anregungen wurde ich dazu gebracht, meine Studie und meine Dissertation bis zum Ende auf hohem Niveau zu schreiben.

Frau Prof. Katrin Hartmann danke ich zudem, dass ich mein Wissen und meine Erfahrungen durch das Specialised Internship in der Notfallmedizin und Anästhesie erweitern und als Notdiensttierärztin an der Klinik arbeiten durfte.

Dem gesamten Team der Neurologie danke ich für die schöne Zusammenarbeit und die tatkräftige Unterstützung im Sammeln meiner Fälle und Liquorproben.

Speziell Sandra Felten möchte ich als Kollegin und Mitkämpferin danken, die immer und zu jeder Zeit mir zur Seite stand und das Sammeln unserer Fälle bis zum Ende unserer Studien vertrauensvoll verfolgte.

Karin Stingl danke ich für die stetige Unterstützung bei meinen immunzytochemischen Untersuchungen der Zellproben. Ich danke ihr für ihre durchwegs positiven Worte und dass sie mich auch bei schlechten Resultaten wieder aufbaute und mich stärkte. Zu jeder Zeit stand sie mir in Rat und Tat zur Seite und stärkte mich in meinen Vorhaben.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann und meiner gesamten Familie, dass sie mich in schlechten Phasen aufgefangen und aufgebaut haben und bei neuen Errungenschaften die Freude mit mir geteilt haben. Ich danke zudem vor allem meiner Mutter, dass sie mir in schwereren Zeiten immer die Kraft und die richtigen Worte geschenkt hat und zu jeder Uhrzeit für mich da war.